

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
FRANCE-HÉLÈNE JONCAS

LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES ISOFORMES D'AKT DANS
LA CHIMIORÉSISTANCE DES CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

MAI 2017

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire, d'abord, le professeur Éric Asselin, Ph. D., mon directeur, pour son accueil, sa supervision, mais aussi sa flexibilité dans les idées de recherche. Je remercie la professeure Monique Cadrin, Ph. D., ma codirectrice, pour sa collaboration. Je veux souligner l'aide importante au niveau technique et théorique de Sophie Parent, professionnelle de recherche, et François Fabi, étudiant au doctorat. Je remercie également Kevin Brasseur, Ph. D., doctorant du laboratoire, Stéphanie Lamontagne, étudiante à la maîtrise, ainsi que Valérie Leblanc, anciennement professionnelle de recherche, pour leurs judicieux conseils et leur support. Enfin, je remercie Pascal Adam, étudiant à la maîtrise, ainsi que Mathieu Raymond-Béliveau, Amélie Roberge-Viau et Matheus Silvia Malo, stagiaires au laboratoire, pour leur contribution expérimentale. Je garderai de bons souvenirs du temps passé avec toute l'équipe.

Je remercie les professeures Céline Van Themsche, Ph. D. et Carole Lavoie, Ph. D. pour le prêt de matériel permettant l'atteinte des objectifs de ce mémoire. Je remercie les membres du jury de prendre le temps d'évaluer ce mémoire.

Je veux brièvement remercier ma famille, mes amies proches ainsi que mon conjoint qui m'ont supportée et encouragée tout au long de ma maîtrise.

AVANT-PROPOS

Le cancer est une maladie extrêmement complexe. Il est causé par une multitude de dérèglements moléculaires et cellulaires résultant de mutations diverses. De plus, pour surmonter ce fléau, on doit se battre contre les cellules mêmes du patient. Il faut éliminer les cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines qui sont très similaires au niveau génétique et phénotypique, contrairement à un pathogène extérieur. Cela en fait un sujet de recherche très intéressant à mon avis. La problématique des cancers hormonaux-dépendants, dont la prolifération est soutenue par les hormones stéroïdiennes, est venue me chercher particulièrement. Mon projet de maîtrise représentait un beau défi pour moi. Pour mieux traiter les cancers gynécologiques, il est essentiel de comprendre leur fonctionnement moléculaire. C'est dans cet objectif global que j'ai entrepris le projet. En connaissant mieux les voies de signalisation dérégulées, on peut identifier de façon plus précise les cibles thérapeutiques. Cela permet ainsi d'appliquer le traitement le plus efficace pour chaque tumeur dans une perspective de médecine personnalisée.

Mon projet de maîtrise s'est attardé à caractériser la localisation des isoformes d'Akt dans un contexte de chimiorésistance dans les cancers gynécologiques. L'expérimentation est présentée sous la forme d'un article faisant office de deuxième chapitre de ce mémoire. Il a permis de rappeler l'importance de l'expression d'Akt dans la résistance au cisplatine. J'ai aussi constaté quelques particularités au niveau de la distribution intracellulaire des isoformes d'Akt. À ma connaissance, c'est la première étude à explorer ce mode de régulation d'Akt dans ce contexte précis. Les données suggèrent donc des pistes à approfondir. Toutefois, les résultats obtenus devront certainement être confirmés par d'autres méthodes. Quelques-unes sont abordées dans la discussion. Enfin, il y a encore beaucoup de travail à faire pour bien comprendre la régulation d'Akt dans la chimiorésistance, au niveau de la contribution spécifique de chaque isoforme ainsi que l'implication de leur localisation intracellulaire, entre autres.

RÉSUMÉ

Le cancer est la principale cause de mortalité en occident et les cancers gynécologiques sont parmi les plus fréquents. La chimiorésistance fait partie des premiers obstacles au traitement de ces cancers, qu'elle soit acquise, dans le cas du cancer endométrial, ou innée contre certains médicaments, comme dans le cancer ovarien. Les isoformes d'Akt sont des protéines de signalisation majeures dans plusieurs processus tumoraux incluant la chimiorésistance. Des études ont démontré leur implication dans la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine. En fonction du cancer, l'importance relative de chaque isoforme varie. Akt1 et Akt2 semblent particulièrement importants dans les cancers gynécologiques. Toutefois, nous ne connaissons pas encore le mécanisme moléculaire leur permettant de bloquer l'activité du cisplatine. C'est particulièrement ce qui fait la différence entre les isoformes d'Akt qui est mal compris. Pourtant, ils ont des rôles bien distincts au niveau physiologique et dans le cancer. Akt peut être régulé par sa phosphorylation, son expression, sa stabilité, mais également son transport. Il peut être transloqué entre le cytosol et le noyau par les protéines TCL-1 et CRM-1. La dernière est impliquée dans certains mécanismes de chimiorésistance. Il s'agit aussi d'une cible thérapeutique. Quelques études ont approfondi l'interaction entre Akt et CRM-1. Toutefois, les signaux responsables de la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt restent inconnus. Considérant cela, le projet présenté ici a permis d'approfondir la régulation de la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt dans un contexte de chimiorésistance.

L'expression totale ainsi que la distribution entre le cytosol et le noyau de chaque isoforme en réponse au cisplatine ont été analysées. L'export nucléaire médié par CRM-1 a été investigué pour l'implication du transport d'Akt dans la chimiorésistance. La sensibilité des lignées cellulaires cancéreuses a été évaluée par les marqueurs d'apoptose. La perte protéique d'Akt1 et Akt2 corrélait avec l'augmentation de l'apoptose. L'augmentation spécifique d'Akt1 dans les cellules résistantes le distingue dans la réponse au cisplatine. En plus de l'expression totale d'Akt, les résultats révèlent que leur localisation relative change. Akt1 était presque exclusivement diminué au noyau tandis que la perte cytosolique d'Akt2 corrélait davantage avec la sensibilité à l'apoptose. À notre connaissance, il s'agit de la première étude sur la localisation d'Akt dans les cancers gynécologiques et en réponse au cisplatine. La recherche devra tout de même continuer à explorer la régulation de cette protéine clé pour maîtriser son implication et la cibler stratégiquement en thérapie.

Mots-clés : Cancer, chimiorésistance, Akt, apoptose, localisation, cisplatine, CRM-1, transport nucléaire

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Revue de littérature.....	2
1.2.1 Le cancer.....	2
1.2.1.1 Causes du cancer.....	3
1.2.1.2 Les cancers gynécologiques	4
1.2.2 Les thérapies anticancéreuses	11
1.2.2.1 Chimiothérapie	13
1.2.2.2 Obstacles aux traitements contre le cancer	17
1.2.3 Chimiorésistance.....	23
1.2.4 Voie PI3K/Akt.....	25
1.2.4.1 Régulation physiologique de la voie PI3K/Akt.....	25
1.2.4.2 Rôle physiologique d'Akt.....	30
1.2.4.3 Les isoformes d'Akt	37
1.2.5 Transport cytosol-noyau	40
1.2.5.1 Export nucléaire : CRM-1	40
1.2.5.2 Import nucléaire : TCL-1.....	45
1.2.6 Voie PI3K/Akt dans le cancer	46
1.2.6.1 Modulateurs en amont d'Akt.....	46
1.2.6.2 Akt1 dans les cancers gynécologiques	48

1.2.6.3 Akt2 dans les cancers gynécologiques	50
1.2.6.4 Akt3 dans les cancers gynécologiques	54
1.2.7 Thérapies combinées contre la chimiorésistance.....	56
1.3 Intérêt de la recherche.....	58
1.4 Hypothèse et objectifs.....	59

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DE LA LOCALISATION DES ISOFORMES D'AKT DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCERS GYNÉCOLOGIQUES.....

60

2.1 Contribution des auteurs	60
2.2 Résumé de l'article	60
2.3 Titre de l'article	62
Abstract.....	62
Introduction.....	63
Materials and methods.....	66
Reagents and antibodies.....	66
Cell culture and treatments with cisplatin and leptomycin B	66
Western blots of Akt isoforms and apoptosis markers	67
Immunofluorescence of leptomycin B efficiency control	68
Statistical analysis.....	68
Results	68
Decreased expression of Akt1 and Akt2 in presence of cisplatin.....	68
Increased apoptosis in cisplatin-sensitive cells.....	71
Combined effect of cisplatin and leptomycin B on Akt expression and apoptosis.....	71
Discussion.....	72
Conclusion	78
Declarations	78
Abbreviations.....	78
Acknowledgment	79
References.....	80
Legends.....	85

Tables.....	88
Figures	89
CHAPITRE III	
DISCUSSION	96
3.1 Interprétations découlant du projet de recherche.....	98
3.2 Perspectives du projet de recherche.....	102
3.3 Conclusion	106
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Principales caractéristiques des stades et grades du cancer endométrial	6
1.2	Principales caractéristiques des stades et grades du cancer ovarien	10
1.3	Principales modifications post-traductionnelles d'Akt.....	29

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Fréquence des cancers chez les femmes canadiennes.....	3
1.2	Schéma du système reproducteur féminin	5
1.3	Rapport de survie relative pour les cancers gynécologiques	7
1.4	Schéma de l'intérieur d'un ovaire.....	8
1.5	Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	15
1.6	Les grandes caractéristiques tumorales et les principales voies associées	18
1.7	Activation de la voie Akt	27
1.8	Mécanismes d'inhibition de l'apoptose par Akt	32
1.9	Implication d'Akt dans la régulation du métabolisme du glucose.....	33
1.10	Rôle d'Akt dans l'activation de la traduction par mTORC1	34
1.11	Rôle proapoptotique nucléaire d'Akt par l'intermédiaire de Cdk2	36
1.12	Structure des isoformes d'Akt	37
1.13	Mécanisme d'export nucléaire médié par CRM-1	41
1.14	Liaison de la leptomycine B à CRM-1	44
1.15	Rôle d'Akt2 dans la résistance au cisplatine.....	53
3.1	Schéma résumant les conclusions du projet de recherche	101
3.2	Clivage d'Akt3 dans les KLE	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Ack1	Activated Cdc42-associated tyrosine kinase 1
Akt1/2/3	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/2/3
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bax	Bcl-2 associated X apoptosis regulator
BRCA1/2	Breast cancer 1/2
Cdk1/2	Cyclin-dependant kinase 1/2
Chk1	Checkpoint kinase 1
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRM-1	Chromosome region maintenance-1
DNA-PK	DNA-dependant protein kinase
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER α	Estrogen receptor α
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
ERK3	Extracellular signal-regulated kinase 3
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FOXO	Forkhead box protein O
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
ILK	Integrin-linked kinase
IRS-1	Insulin-receptor substrate-1
LMB	Leptomycine B

JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPKAPK-2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2
MDM2	Mouse double minute 2
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MLH-1	MutL homolog 1
mTORC1/2	Mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1/2
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NES	Nuclear export signal (signal d'export nucléaire)
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nuclear localization signal (signal de localisation nucléaire)
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PCAF	p300/CBP-associated factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PH	Pleckstrin homology
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PKC	Protein kinase C
PP2A	Protein phosphatase 2A
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol triphosphate
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RanBP1	Ran Binding Protein 1

RanGAP	RanGTPase Activating Protein
RanGTP/GDP	Ran Guanine Tri/diphosphate
Rb	Retinoblastoma protein
TCL-1	T-cell leukemia 1
TDP2	Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2
TEM	Transition épithéliale-mésenchymateuse
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TRAIL	TNF α -related apoptosis inducing ligand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine-1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XPO-1	Exportin-1

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Problématique

La recherche biomédicale porte une attention particulière au traitement du cancer depuis plusieurs décennies. Cette maladie est difficile à traiter par rapport à une infection causée par un pathogène puisqu'il faut lutter contre les cellules mêmes du patient. Il s'agit de détruire les cellules tumorales sans endommager les cellules saines ce qui est très complexe. En effet, il y a très peu de différences entre ces deux catégories de cellules qui nous permettent de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, contrairement aux bactéries infectieuses contre lesquelles il existe des antibiotiques, par exemple. Une des sphères de la recherche biomédicale s'attarde à cibler les caractéristiques spécifiques des cellules tumorales qui se multiplient de façon anarchique. Cette sphère a donc pour but d'identifier ces signes distinctifs pour les utiliser contre les cellules cancéreuses. Malheureusement, les mécanismes moléculaires responsables du développement et de la progression du cancer ne sont pas encore très bien compris. Le cancer reste donc une importante cause de décès.

Chez la femme, les cancers gynécologiques font partie des plus fréquents et des plus mortels. Notre laboratoire se concentre sur le cancer de l'endomètre et de l'ovaire. Nous étudions les mécanismes moléculaires impliqués dans la chimiorésistance. On parle de chimiorésistance lorsque le cancer est résistant aux traitements de chimiothérapie. Le projet de recherche dont il est question ici s'inscrit donc dans cette thématique.

Le sujet de ce mémoire est abordé d'abord à travers une revue de la littérature faisant état de ce qui est connu sur les cancers gynécologiques, les mécanismes de

chimiorésistance et la régulation de la protéine Akt (V-akt murine thymoma viral oncogene). Cette analyse littéraire permet de cerner ce qui est moins bien compris sur Akt dans le contexte de la chimiorésistance des cancers gynécologiques. Il en découle, l'hypothèse du mémoire ainsi que les différents objectifs de cette recherche. Le second chapitre présente les résultats qui constitue le cœur de ce mémoire et synthétise les conclusions tirées des travaux de recherche pratiques en laboratoire. Enfin, une discussion vient compléter certains éléments abordés brièvement dans l'article et présenter les avenues futures découlant du présent projet.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 Le cancer

Un cancer est constitué de cellules qui prolifèrent de façon désorganisée, ce qui peut nuire au bon fonctionnement des organes et entraîner la mort [1, 2]. Chaque organe et chaque tissu possèdent plusieurs types de cellules bien définis et disposés de façon structurée [2]. Normalement, les signaux que s'échangent ces cellules maintiennent l'équilibre des tissus et assurent que chaque cellule est à sa place et accomplit son rôle. Autrement, ces cellules sont éliminées pour éviter de nuire à leur hôte. Dans le cas des cellules cancéreuses, celles-ci ne répondent plus aux signaux responsables de cet équilibre [1]. Elles se mettent à se multiplier fortement, même à un endroit inapproprié. Elles envahissent donc les tissus d'organes essentiels sans pour autant en jouer le rôle. Cela a pour effet, à plus ou moins long terme selon le site de la tumeur, d'entraver le fonctionnement des organes envahis et donc, éventuellement, de causer la mort.

Un cancer peut provenir d'une seule cellule qui acquiert des caractéristiques favorisant sa survie et sa division [1, 3]. Elle forme ainsi une masse de tissu intrus qui est nommée tumeur. La tumeur s'étend à travers les tissus sains au fur et à mesure que le cancer progresse. La formation de métastases se produit lorsque certaines cellules se détachent de la tumeur d'origine, la tumeur primaire, pour entrer dans la circulation sanguine et former des tumeurs secondaires [1]. Ce phénomène rend le traitement du

cancer beaucoup plus ardu puisque les thérapies localisées moins dommageables ne sont plus efficaces.

1.2.1.1 Causes du cancer

Principalement avec le vieillissement de la population et l'industrialisation, l'incidence du cancer a fortement augmenté [4]. Malgré l'amélioration des techniques de diagnostic et des traitements, le cancer reste une importante cause de décès à travers le monde. Au Canada, c'est la première cause de décès avant même les maladies du cœur [5]. Le cancer le plus fréquent chez l'homme est celui du poumon et le cancer du sein chez la femme [4]. Ils sont également les plus mortels mondialement, mais le taux de mortalité pour un cancer donné dépend beaucoup du niveau d'industrialisation du pays. L'accès aux méthodes diagnostiques et aux traitements de pointe influence grandement l'issue d'un cancer. Par exemple, malgré le fait que le cancer du sein soit le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes canadiennes (Figure 1.1), elles ont 87 % de chance de survivre cinq ans et plus [6].

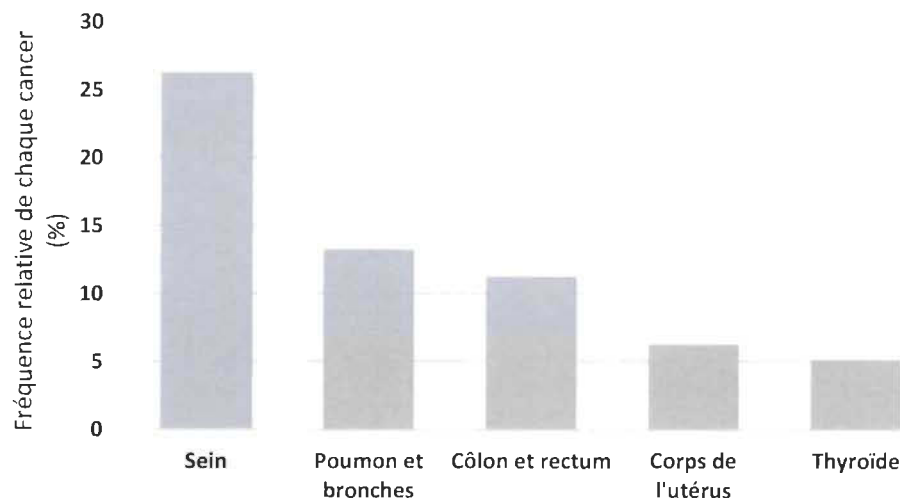


Figure 1.1 Fréquence des cancers chez les femmes canadiennes.

Les cinq cancers les plus fréquents chez les femmes canadiennes sont classés en ordre d'importance en pourcentage par rapport au nombre total de cas de cancer. Les données proviennent de Statistiques Canada en 2016.

Il est difficile de cibler les causes exactes d'un cancer. Il s'agit d'un ensemble variant d'un individu à l'autre. Il existe plusieurs facteurs environnementaux bien connus [4, 7] et certains facteurs génétiques [8, 9]. Toutefois, l'importance de la génétique dans le développement du cancer ne fait pas consensus. Elle semble varier d'un cancer à l'autre et en fonction des gènes mutés. Beaucoup de variations génétiques constitueraient plutôt une prédisposition. Parmi les facteurs environnementaux, on retrouve plusieurs éléments reliés à notre mode de vie tels que la qualité de l'alimentation ainsi que le niveau d'activité physique [10]. En effet, l'embonpoint est responsable de près de 4 % des cancers mondialement, mais son implication peut atteindre jusqu'à 50 % dans certains cancers [11]. La consommation d'alcool et le tabagisme sont aussi d'importants facteurs [4]. Certaines infections chroniques, causées surtout par des virus affectant un organe spécifique, peuvent favoriser l'apparition d'une tumeur dans l'organe en question [4, 7]. On connaît, par exemple, le virus de papillome humain qui cause le cancer du col de l'utérus et les virus hépatiques qui favorisent le cancer du foie [4]. Enfin, certaines substances chimiques industrielles ainsi que des radiations, telles que les rayons ultra-violet, peuvent aussi causer un cancer en fonction du degré d'exposition [7]. Certains de ces facteurs environnementaux induisent des modifications directement dans notre ADN qui s'accumulent avec l'âge, et qui sont très similaires aux modifications retrouvées dans les tumeurs [12]. Le vieillissement de la population accentue l'accumulation de ces mutations ou des modifications épigénétiques. Les dernières affectent les portions non-codantes des gènes. Il semble donc que nous ayons chacun un certain contrôle sur nos risques de développer un cancer à long terme.

1.2.1.2 Les cancers gynécologiques

Parmi les cancers gynécologiques, on retrouve le cancer de l'endomètre (Figure 1.2). L'endomètre est la couche de tissu qui tapisse l'intérieur de l'utérus, composé d'un épithélium en contact avec la lumière de l'utérus, et d'une couche stromale contenant les glandes. Lors d'une grossesse, l'embryon s'implante dans l'endomètre.

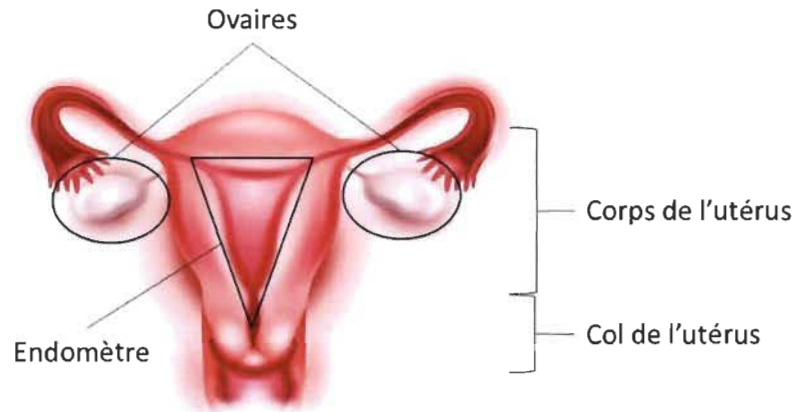


Figure 1.2 Schéma du système reproducteur féminin.

L'utérus est composé du corps, la partie supérieure, et du col, la partie inférieure. Sa paroi interne est recouverte de l'endomètre. Les ovaires sont situés de part et d'autre du corps de l'utérus à l'entrée des trompes utérines. L'illustration est tirée de <http://sante-guerir.notrefamille.com>

Le cancer endométrial débute souvent par une hyperplasie de l'endomètre, c'est-à-dire une prolifération anormalement élevée des cellules, mais qui conservent leur fonction. L'hyperplasie est provoquée majoritairement par l'exposition aux estrogènes qui n'est pas contre balancée par la progestérone [13]. Combiné à ce processus, il y a l'apparition de certaines mutations clés dans les voies de signalisation dont dépend fortement le tissu endométrial pour proliférer. L'activation des voies Akt et COX-2 (cyclooxygénase-2) serait cruciale ; la première sera abordée en détail plus loin [13]. Il y a alors un important déséquilibre dans la signalisation de la cellule, au niveau de la prolifération et l'apoptose, entre autres. C'est à ce moment que les cellules ne répondent plus aux signaux de contrôle environnants, ne jouent plus leur rôle et génèrent une tumeur. Au premier stade, le cancer reste confiné au niveau du corps de l'utérus (Figure 1.2) [14, 15]. Graduellement, il progresse à travers le col de l'utérus ce qui correspond au stade II. Par la suite, le cancer s'étend fréquemment dans la région pelvienne et aux nœuds lymphatiques avoisinants (stade III). On parle du stade IV lorsque le cancer forme des métastases de plus en plus distantes de l'utérus en passant par la vessie ou les intestins jusqu'aux organes éloignés. La progression tumorale selon les stades ainsi que les critères de chaque grade sont résumés dans le Tableau 1.1. Les deux paramètres sont indépendants l'un de l'autre. Les grades indiquent le niveau

d'agressivité des cellules tumorales, qui est inversement proportionnel à leur niveau de différenciation, ainsi que la portion de tumeur dans les tissus examinés par le pathologiste [16, 17]. Les cellules bien différenciées sont plus similaires aux cellules saines et ont une capacité d'invasion faible, tandis que les cellules peu différenciées peuvent migrer et former des métastases plus rapidement [18, 19].

Tableau 1.1

Principales caractéristiques des stades et grades du cancer endométrial

Stade	Progression tumorale	Grade	Agressivité des cellules tumorales	Proportion de tumeur
I	Corps de l'utérus	1	Bien différenciées	< 5 %
II	Col de l'utérus	2	Modérément différenciées	5-50 %
III	Région pelvienne et nœuds lymphatiques	3	Faiblement différenciées	> 50%
IV	Métastases distantes	-		

Le cancer de l'endomètre est plus souvent diagnostiqué chez les femmes ménopausées. Le principal facteur de risque pour ce cancer est une exposition prolongée à un taux élevé d'estrogène, soit par la prise de médicaments ou un dérèglement hormonal [14, 20]. Or, il est courant d'utiliser un substitut d'estrogène chez les femmes ménopausées pour diminuer certains symptômes inconfortables [21]. L'obésité favorise également le développement du cancer endométrial, entre autres, parce que le tissu adipeux produit lui-même des estrogènes [22].

Le cancer endométrial peut être diagnostiqué assez tôt puisque certains symptômes tels que les saignements vaginaux sont faciles à repérer [15, 23]. La tumeur peut donc être traitée rapidement et efficacement selon les méthodes détaillées plus loin. Le taux de survie des patientes atteintes d'un tel cancer est donc élevé, soit près de 80 % lorsqu'il est diagnostiqué en stade précoce [23]. La Figure 1.3 présente le taux de survie des femmes canadiennes atteintes de cancers gynécologiques. Certains cancers endométriaux de stade avancé ainsi que les tumeurs récidivantes sont beaucoup plus difficiles à traiter puisqu'ils ne répondent pas à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie,

respectivement [23]. En effet, jusqu'à 15 % des cancers endométriaux de stade faible présentent une rechute selon la modalité de traitement lors du premier diagnostic [24, 25]. Ce taux descend à 3-4 % lorsque les patientes reçoivent un traitement de radiothérapie. On observe 50 % de récurrence dans le cas des cancers de stade élevé (III-IV) ou plus agressif [26]. Ces données confirment l'importance d'améliorer les traitements de première ligne.

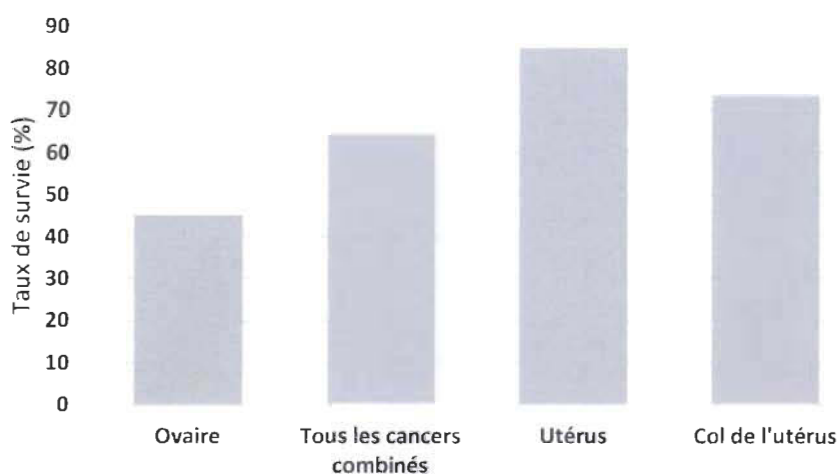


Figure 1.3 Rapport de survie relative pour les cancers gynécologiques.

Le taux de survie sur cinq ans, en pourcentage, pour les cancers de l'ovaire, de l'utérus (endomètre majoritairement) et du col de l'utérus sont comparés à celui de l'ensemble des cancers chez les femmes canadiennes. Les données proviennent de Statistiques Canada en 2015.

La situation est différente pour le cancer de l'ovaire. Les ovaires sont disposés de part et d'autre de l'utérus (Figure 1.2). Ils sont retenus à l'extrémité des trompes utérines par plusieurs ligaments [27]. Ils servent principalement à la production des ovocytes qui deviendront des ovules une fois fécondés. Mais ils ont également un rôle essentiel dans la production des hormones sexuelles, les œstrogènes et la progestérone. Les ovaires sont composés de plusieurs couches ayant chacune un rôle spécifique (Figure 1.4). Au centre, on retrouve la médulla qui contient les vaisseaux sanguins servant à nourrir les tissus [27]. Ensuite, le cortex de l'ovaire contient les follicules en croissance qui donneront à tour de rôle un ovocyte à chaque cycle menstruel. Le cortex est entouré d'une fine couche de tissu conjonctif nommé l'albuginée. Elle est elle-même recouverte

d'une couche de cellules épithéliales qui constitue la surface externe de l'ovaire. Lors de l'ovulation, les ovocytes doivent être libérés par une brèche à travers l'albuginée et l'épithélium.

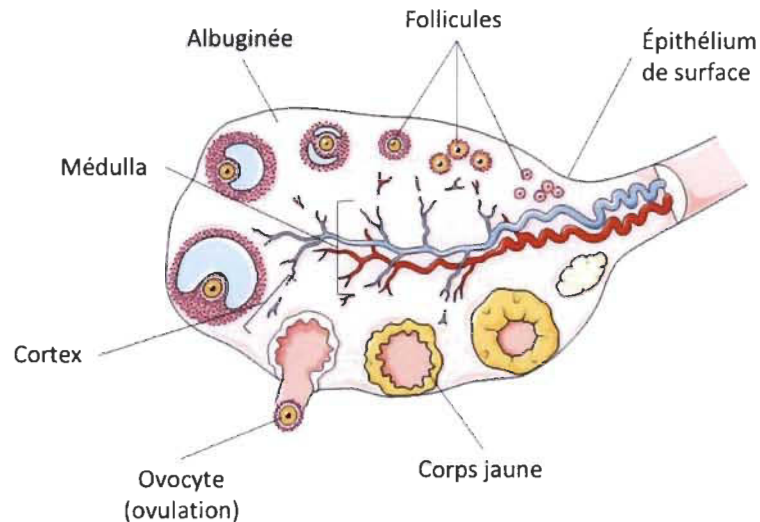


Figure 1.4 Schéma de l'intérieur d'un ovaire.

L'ovaire est recouvert par un épithélium de surface posé sur l'albuginée, une autre fine couche de tissu. L'intérieur de l'ovaire est composé d'abord du cortex contenant les follicules qui se développent en ovocytes, relâchés lors de l'ovulation à travers l'albuginée et l'épithélium. Ce phénomène laisse place à la formation d'un corps jaune. Le cœur de l'ovaire constitue la médulla qui contient les vaisseaux sanguins. L'illustration est tirée de :

<https://sites.google.com/site/sciencesnaturellescinetieille/cours/svt-4e/2013-2014/3-1>

Il est reconnu que 90 % des cancers ovariens proviennent de l'épithélium [28]. Toutefois, certaines études récentes tendent à montrer qu'une importante proportion des cancers de l'épithélium de surface de l'ovaire découleraient plutôt de tumeurs au niveau des trompes de Fallope [29]. En effet, le carcinome séreux de haut grade possède des caractéristiques très similaires aux tumeurs péritonéales et des trompes utérines [30]. Or, ce type de cancer de l'ovaire est le plus fréquent et le plus mortel, avec un taux de survie dépassant à peine 30 % [29, 31, 32]. Les autres types de cancers ovariens dérivent principalement des cellules germinales (ovocytes) et du stroma de l'ovaire (cortex et médulla) [33]. Avec l'âge, l'épithélium devient de plus en plus irrégulier avec des

invaginations et des kystes épithéliaux atteignant le stroma de l'ovaire, dus aux ovulations répétées. Il semble que ces amas de cellules soient des sites prédisposés au développement d'un cancer de l'ovaire. Selon certains auteurs, leur emplacement au cœur du stroma de l'ovaire pourrait augmenter l'accès à divers facteurs favorisant la prolifération cellulaire tels que des cytokines et des hormones [34]. De plus, contrairement aux autres épithéliums, celui en surface de l'ovaire possède des caractéristiques mésenchymateuses. Il conserve sa capacité de transition d'un phénotype stromal à épithélial, et vice-versa. Cette caractéristique est essentielle pour la régénération de l'ovaire lors de l'ovulation. Or, les cellules acquièrent un phénotype épithélial lorsqu'elles deviennent néoplasiques. Le processus de différenciation peut générer divers types de cellules épithéliales, ce qui sert à catégoriser les carcinomes ovariens. Les cellules ainsi différenciées répondraient moins bien aux signaux de l'environnement tissulaire tout comme des cellules tumorales. Selon les mêmes auteurs, le microenvironnement de l'ovaire induirait également des modifications génétiques dans les cellules des kystes pour les rendre cancéreuses [34].

Le Tableau 1.2 résume les critères correspondant aux stades et grades du carcinome ovarien. Au premier stade d'un cancer épithélial ovarien, la tumeur est confinée aux ovaires ou aux trompes utérines [35]. Elle se développe d'abord dans le stroma d'un ovaire, ou d'une trompe, puis de l'autre et progressivement atteint leur surface externe. Ensuite, le cancer s'étend à l'utérus et de façon localisée dans la région pelvienne ce qui correspond au stade II. Un stade III est diagnostiqué lorsqu'on détecte les premières métastases dans les nœuds lymphatiques rétropéritonéaux ou dans le péritoine au-delà de la région pelvienne. Le cancer progresse en formant des métastases dans les organes éloignés hors de l'abdomen (stade IV). Les métastases sont le plus souvent observées dans le foie, la rate et les poumons [36]. Les cancers ovariens se divisent en trois grades qui indiquent l'agressivité de la tumeur. Ils se définissent de la même façon que dans le cancer endométrial [16, 17].

Tableau 1.2

Principales caractéristiques des stades et grades du cancer ovarien

Stade	Progression tumorale	Grade	Agressivité des cellules tumorales	Proportion de tumeur
I	Ovaires ou trompes utérines	1	Bien différenciées	< 5 %
II	Utérus et région pelvienne	2	Modérément différenciées	5-50 %
III	Métastases péritonéales	3	Faiblement différenciées	> 50 %
IV	Métastases distantes	-		

Il existe quelques facteurs de prédisposition particulièrement associés au cancer de l'ovaire. D'abord, le risque augmente fortement avec l'âge jusqu'à atteindre un plateau autour de la cinquantaine [33]. Plusieurs modalités de reproduction sont déterminantes dans le développement d'un cancer ovarien. Par exemple, le fait de n'avoir jamais eu de grossesse ou une fréquence d'ovulation élevée (naturelle ou pharmaceutique) augmentent les risques de cancer ovarien. Tandis que la prise de la pilule contraceptive a un effet protecteur en régulant l'environnement hormonal [33, 34]. Une diète riche en gras favorise aussi fortement l'apparition de ce cancer [33]. Enfin, la génétique est à considérer. Environ 10 à 20 % des cancers ovariens seraient associés à des mutations [37]. Les plus fréquentes sont des mutations dans les gènes *BRCA1/2* (breast cancer 1/2) reconnues pour prédisposer aussi au cancer du sein [38]. Ces mutations, transmises à travers les générations, causent la perte de fonction des protéines par l'apparition d'un codon stop prématuré. Ce sont des protéines importantes dans la réparation de l'ADN. Leur perte facilite donc l'apparition et la progression tumorale.

Le plus grand problème avec le cancer ovarien est son diagnostic tardif. Selon une étude statistique américaine de 2015, la majorité des cancers ovariens sont découverts à un stade avancé [39]. C'est, entre autres, le cas pour le carcinome séreux de haut grade habituellement diagnostiqué au stade III ou IV [30, 36]. Un stade avancé ainsi qu'un grade avancé sont signe d'un cancer métastatique et agressif respectivement, deux paramètres qui rendent un cancer beaucoup plus difficile à traiter. En effet, les cancers de stade III et IV répondent moins bien aux traitements. Et on observe plus de

70 % de mortalité chez les femmes atteintes d'un cancer ovarien avancé [36]. Le carcinome séreux de haut grade est le plus fréquent et les rechutes de cancer ovarien sont majoritairement de stade avancé, ce qui peut expliquer le faible taux de survie global (50 %) comparativement aux autres cancers. La Figure 1.3 présente une comparaison des taux de survie de plusieurs cancers chez les femmes canadiennes. Celui-ci est nettement inférieur à la moyenne dans le cancer de l'ovaire. Ces obstacles en font le 5^e cancer le plus mortel chez les femmes occidentales [39]. Il faut donc travailler à améliorer les techniques de diagnostic et les traitements.

1.2.2 Les thérapies anticancéreuses

Dès le diagnostic d'un cancer, un plan de traitement adapté est mis sur pied. Il inclut d'abord la chirurgie qui permettra d'enlever physiquement la tumeur si elle est accessible sans endommager les tissus sains. Dans ce cas, on parle de résection d'une tumeur. Sinon, la chirurgie peut servir à réduire la taille de la tumeur. Cela améliore l'efficacité des thérapies subséquentes. La chirurgie est la première méthode utilisée pour traiter les cancers gynécologiques qui sont encore restreints à la région pelvienne [40]. Dans le cas d'un cancer endométrial, l'utérus, les trompes et les ovaires sont complètement retirés ainsi que les nœuds lymphatiques atteints [41]. Les tumeurs sont habituellement retirées par laparoscopie assistée par robotique. Ceci consiste en un tube contenant une caméra et les accessoires chirurgicaux inséré à travers une petite incision permettant ainsi une chirurgie moins invasive [23]. Chez les femmes ménopausées, l'utérus et les ovaires peuvent être complètement retirés sans entraver significativement la qualité de vie d'une patiente. Dans le cas des femmes non ménopausées et désirant avoir des enfants, d'autres options thérapeutiques doivent être envisagées. Il peut s'agir de radiothérapie, hormonothérapie ou chimiothérapie selon le type de cancer endométrial et son grade. Ces modalités de traitement sont élaborées plus loin. À l'opposé, la chirurgie est principalement réductrice pour traiter un cancer ovarien, puisque celui-ci est souvent diagnostiqué à un stade avancé [42]. Elle est parfois combinée à la radiothérapie ce qui peut améliorer le taux de succès [24]. Cette modalité

complémentaire permet d'éliminer les cellules cancéreuses qui seraient restées dans la région pelvienne suite à la résection de la tumeur.

La radiothérapie est un traitement qui cible la tumeur et ses environs. Elle consiste à irradier la tumeur à l'aide de rayons X ou gammas pour provoquer des dommages à l'ADN des cellules [43]. Cela provoque l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules ciblées par des mécanismes variables en fonction de la dose de radiations ionisantes. La radiothérapie est utilisée principalement comme complément à la chirurgie pour les cancers endométriaux de stades précoces. Elle permet, entre autres, de diminuer le taux de récurrence chez les femmes à risque [41]. Elle est administrée par un rayon externe dirigé sur la région pelvienne ou par curiethérapie vaginale où la source de radiation est insérée à l'intérieur du vagin [44]. Cette deuxième méthode est un peu plus efficace et provoque moins d'effets secondaires. Pour traiter le cancer de l'ovaire, la radiothérapie est très peu utilisée. Elle est parfois employée comme traitement palliatif pour diminuer les symptômes d'un stade avancé ou en complément à la chirurgie pour s'assurer d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles [45].

Puisque l'utérus et les ovaires sont des tissus répondant aux hormones, l'hormonothérapie peut être utilisée pour traiter les cancers gynécologiques. Dans l'utérus, il y a un équilibre essentiel entre l'estrogène qui favorise la prolifération cellulaire et la progestérone qui, au contraire, favorise la différenciation cellulaire [41]. Les progestatifs (molécules similaires à la progestérone) sont les plus souvent administrés pour diminuer la prolifération des cancers endométriaux de type endométrioïde [26]. Ces tumeurs répondent efficacement à la progestérone grâce à l'expression de son récepteur membranaire lorsqu'elles sont de grade faible [14]. D'autres molécules qui s'apparentent à la chimiothérapie, telles que le tamoxifène, ont un effet similaire. Celles-ci inhibent plutôt la signalisation de l'estrogène par leur effet antagoniste sur son récepteur [40]. Ils sont surtout efficaces lorsque combinés à un progestatif. Dans le cas du cancer ovarien, on utilise principalement le tamoxifène et des inhibiteurs de l'aromatase [46]. Ces derniers bloquent plutôt la production d'estrogène

[47]. Ce type de thérapie est rarement utilisé pour traiter le cancer ovarien. Elle est néanmoins moins agressive pour le corps que la chimiothérapie.

1.2.2.1 Chimiothérapie

La chimiothérapie est le type de traitement généralisé le plus répandu. Elle consiste en l'administration systémique d'une molécule pour bloquer la croissance ou induire la mort des cellules cancéreuses. Les traitements de chimiothérapie peuvent donc atteindre et potentiellement affecter toutes les cellules du corps. Il en existe plusieurs catégories en fonction de leur cible. Ils sont divisés en deux grandes classes, soit les agents cytotoxiques et les agents ciblés. Ces composés peuvent être de petites molécules synthétiques ou d'origine naturelle, comme certains antibiotiques de la famille des anthracyclines. Des anticorps sont aussi utilisés pour cibler une protéine spécifique.

Les agents cytotoxiques induisent la mort des cellules cancéreuses par des mécanismes généraux présents dans toutes les cellules [48, 49]. Parmi eux, les anti-métabolites vont remplacer un composé essentiel dans un processus cellulaire, comme les nucléosides qui entrent dans la production de l'ADN, pour provoquer le dysfonctionnement des cellules en forte prolifération. Les inhibiteurs mitotiques, comme le paclitaxel, paralysent le fuseau mitotique ce qui induit la mort des cellules en division [50]. Ce médicament est d'ailleurs administré pour traiter le cancer endométrial et ovarien de même que le docetaxel [26, 42, 51]. Une autre catégorie fortement utilisée est celle des agents alkylants, qui induisent des dommages à l'ADN dans les cellules en prolifération pour induire leur mort par apoptose [48]. On retrouve les dérivés de platines, une classe particulière dans ce groupe, qui sera abordée plus en détail plus loin.

D'un autre côté, les agents ciblés induisent la mort ou bloquent la prolifération des cellules cancéreuses en inhibant ou en activant une protéine spécifique. Leur cible peut se trouver seulement dans certains tissus ou types cellulaires, ou même uniquement dans les cellules cancéreuses. Souvent, les cellules cancéreuses sont particulièrement

dépendantes d'une voie de signalisation, contrairement aux cellules saines qui utilisent davantage des voies de compensation. En effet, pour favoriser leur prolifération anarchique et leur survie, les cellules cancéreuses doivent souvent sacrifier certains autres avantages. L'exploration de telles pistes permet le développement de thérapies de plus en plus efficaces et sécuritaires [48]. Ces agents de chimiothérapie ciblent particulièrement des récepteurs ou leurs kinases intracellulaires qui sont fortement suractivés ou surexprimés dans les cellules cancéreuses et qui favorisent ainsi la prolifération et la survie cellulaire. [49] Nombreux inhibiteurs de ce type sont en essai clinique actuellement chez des patientes atteintes d'un cancer endométrial pour bloquer la kinase Akt, par exemple [41, 52]. Ensuite, plusieurs molécules anticancéreuses ont été développées ou exploitées pour inhiber spécifiquement les topoisomérases. Cette famille de protéines permet l'organisation de l'ADN condensé dans la cellule ainsi que sa réorganisation lors de la réplication. Leur inhibition provoque donc une accumulation de dommages à l'ADN due à une réplication défectueuse, ce qui induit l'apoptose. Les cellules à prolifération rapide, dont les cellules cancéreuses, sont particulièrement sensibles à ce traitement [53, 54]. De tels inhibiteurs sont utilisés pour traiter le cancer de l'endomètre, soit le doxorubicine, et le cancer de l'ovaire, soit le topotecan [15, 53]. La chimiothérapie peut également cibler directement les régulateurs d'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire programmée [55]. L'apoptose peut être déclenchée par la voie extrinsèque (extracellulaire) ou la voie intrinsèque (mitochondriale), résumées dans la Figure 1.5. La première est activée par des récepteurs de mort à la surface des cellules. Le signal peut donc provenir de l'environnement extracellulaire ou des cellules avoisinantes. Des agents tels que le TRAIL (TNF α -related apoptosis inducing ligand), une protéine recombinante, sont actuellement en essai clinique pour leur efficacité à induire l'apoptose par le biais des récepteurs de mort DR4 et DR5, entre autres [52, 56, 57]. Certains modulateurs de l'apoptose intrinsèque sont aussi la cible d'agents chimiothérapeutiques. Ils inhibent spécifiquement des membres de la famille Bcl-2 ou des IAPs (inhibitor of apoptosis protein). Les activateurs de l'apoptose naturellement présents dans les cellules saines sont utilisés comme modèles pour le développement de ces inhibiteurs [55]. En réactivant l'apoptose, ils sensibilisent fortement les cellules cancéreuses à d'autres traitements anticancéreux. Pour traiter les cancers

gynécologiques, très peu d'agents ciblés sont actuellement utilisés. Ils sont pour la plupart en études cliniques [26, 58]. Cependant, certains traitements spécifiques sont déjà approuvés pour les cancers ovariens récurrents; l'olaparib (AZD2281) inhibe PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) impliqué dans la réparation de l'ADN. De son côté, le bevacizumab inhibe l'angiogenèse en ciblant le VEGF (vascular endothelial growth factor) [58]. Les principales molécules de chimiothérapie pour les cancers gynécologiques mentionnées précédemment peuvent être employées seules et en combinaison. En résumé, la chirurgie constitue la première ligne de traitement des cancers endométriaux, combinée à la radiothérapie comme adjuvant, puisque la majorité de ces cancers est détectée à un stade précoce. Pour les stades avancés (métastatiques) ou récurrents et les cancers ovariens souvent diagnostiqués tardivement, la chimiothérapie est préconisée en plus d'une chirurgie pour réduire la tumeur [23].

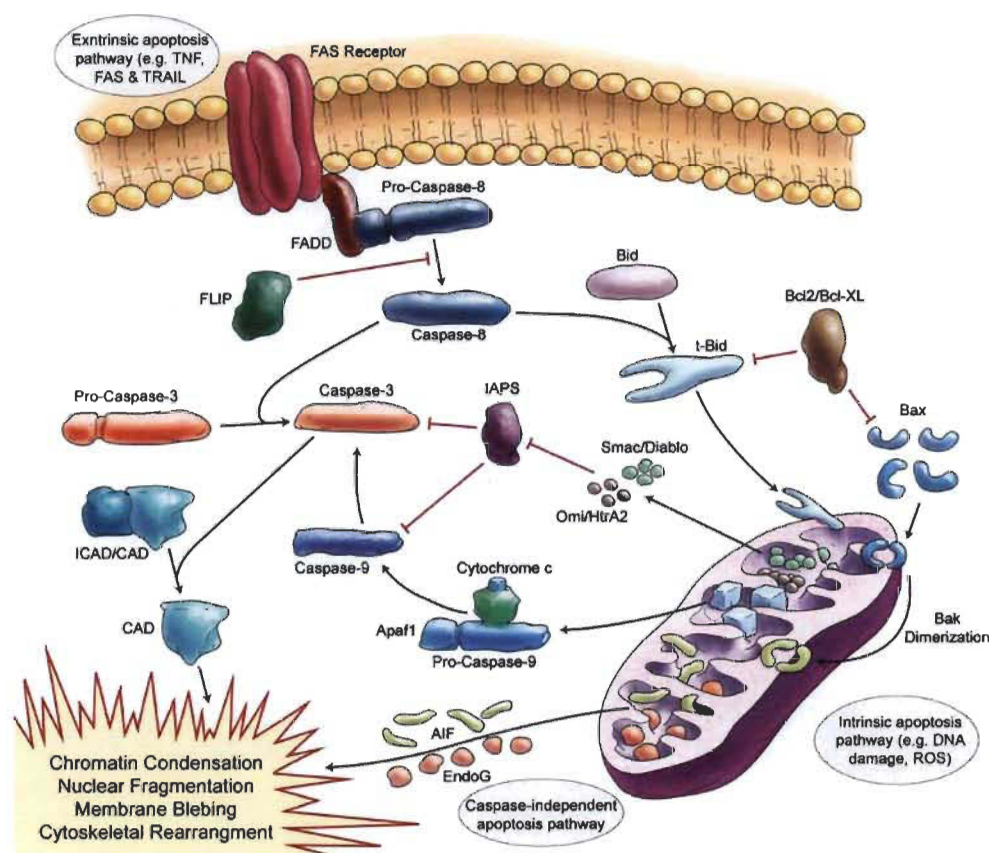


Figure 1.5 Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose commence par un signal extracellulaire se liant aux récepteurs de mort à la surface des cellules (FasR, DR4-5,

etc.). Il s'en suit l'activation des caspases initiatrices (caspase-8) jusqu'au clivage des caspases effectrices communes aux deux voies principales de l'apoptose (caspase-3). La voie intrinsèque est déclenchée par des signaux intracellulaires au niveau de la mitochondrie. C'est par cette voie qu'agissent les agents provoquant des dommages à l'ADN comme le cisplatine. Les membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bid, Bax et Bad) contrôlent la formation de pores dans la membrane de la mitochondrie. Cela permet la sortie du cytochrome c qui s'associe au complexe Apaf-1/pro-caspase-9. La caspase-9 initiatrice est ainsi clivée et donc activée. Elle converge vers la caspase-3. L'apoptose culmine en la condensation de l'ADN et la fragmentation des membranes pour désintégrer la cellule. Les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) telles que XIAP bloquent l'activation des caspases. Les flèches représentent l'activation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. Tirée de Marzban, H. *et al.*, 2013.

La présente recherche se concentre sur un dérivé de platine très répandu, le cisplatine. Il est utilisé depuis les années 1970 pour traiter divers cancers incluant les cancers gynécologiques [40, 42]. C'est même l'agent chimiothérapeutique le plus efficace contre ces cancers encore aujourd'hui, mais il provoque d'importants effets secondaires [40, 59]. En effet, il induit l'apoptose de toutes les cellules en prolifération, saines ou cancéreuses. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires déréglés dans les cellules cancéreuses pour améliorer l'efficacité des traitements actuels et leur spécificité. Le cisplatine (*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)), comme son nom complet l'indique, est une petite molécule synthétique composée d'un cœur de platine lié à deux atomes de chlore et deux groupements amine [60]. À l'intérieur de la cellule, le cisplatine perd un atome de chlore au profit d'une molécule d'eau. Cela permet ensuite au platine de se lier de façon covalente aux bases azotées de l'ADN. Il s'en suit une importante distorsion de l'ADN qui, si elle n'est pas réparée par la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN, induit l'apoptose de la cellule [60, 61]. Le principal mode d'action du cisplatine se passe donc dans le noyau, mais la molécule a aussi un effet cytotoxique dans le cytosol. Le cisplatine interagit avec des composés ayant des propriétés réductrices, comme le glutathion, ce qui détruit l'équilibre d'oxydoréduction en faveur du stress oxydant. Les molécules oxydantes sont extrêmement réactives et causent divers dommages à la cellule qui entre en apoptose [61]. Ces mécanismes d'action en font un traitement

efficace contre les cancers des testicules, de la vessie, colorectal, du poumon, de la tête et du cou, du col de l'utérus, le mélanome et le lymphome [60, 61].

À cause des effets secondaires du cisplatine, plusieurs autres dérivés de platine ont été étudiés. D'abord, le carboplatine a été développé dans les années 1980s. Sa structure est un peu plus complexe que le cisplatine, mais il agit de la même façon. Des études ont démontré qu'il était moins toxique pour les reins et le système nerveux que son précurseur, mais qu'il était également moins efficace contre le cancer [62]. En 2002, l'oxaliplatine a été approuvé aux États-Unis d'abord pour le traitement du cancer colorectal [63]. Il permet de surmonter partiellement la résistance au cisplatine par son mode d'action différent. Pour cibler particulièrement les cancers dépendants des estrogènes, notre équipe a récemment développé le VP-128 [64, 65]. Il s'agit d'un hybride entre le 17β -estradiol et le cisplatine. Son efficacité anti-cancéreuse serait supérieure au cisplatine dans le cancer du sein et de l'ovaire *in vitro* de même que dans des modèles murins [66, 67]. Cette molécule constitue une avenue prometteuse pour améliorer la chimiothérapie dans les cancers gynécologiques.

1.2.2.2 Obstacles aux traitements contre le cancer

Pour comprendre comment les cellules cancéreuses répondent et résistent aux thérapies, il faut comprendre comment elles fonctionnent d'un point de vue moléculaire. Il y a encore énormément de processus à élucider, mais grâce à la recherche fondamentale, nous comprenons beaucoup mieux le fonctionnement des tumeurs. Hanahan et Weinberg ont résumé les caractéristiques des cellules cancéreuses sous le nom des *Hallmarks* du cancer en 2000 [1]. Ils ont, par la suite, publié une mise à jour plus complète en 2011, présentant de nouvelles caractéristiques et des propriétés favorisant les cellules cancéreuses [68]. Ces particularités apparaissent dans les cellules saines par l'accumulation de mutations et de modifications épigénétiques avec l'âge et l'exposition aux différents facteurs de risques décrits précédemment. Les mutations sont directement dans la séquence de notre ADN ce qui produit des protéines défectueuses, non fonctionnelles hyperactives ou en quantité aberrante.

Les modifications épigénétiques vont plutôt affecter l'expression des gènes. Elles ne sont pas au niveau de la séquence nucléotidique, mais elles peuvent quand même se transmettre aux cellules filles lors de la mitose [69]. L'inflammation favorise aussi le développement de ces caractéristiques tumorales [68]. En effet, les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs peuvent libérer de nombreuses molécules impliquées dans les caractéristiques tumorales. Normalement, les cellules défectueuses sont éliminées par divers mécanismes de mort cellulaire ou par le système immunitaire. Lorsque les mutations confèrent un avantage sélectif à une cellule, elle peut proliférer plus librement et former une tumeur. La Figure 1.6 présente les principales caractéristiques tumorales ainsi que certaines voies de signalisation majeures impliquées.

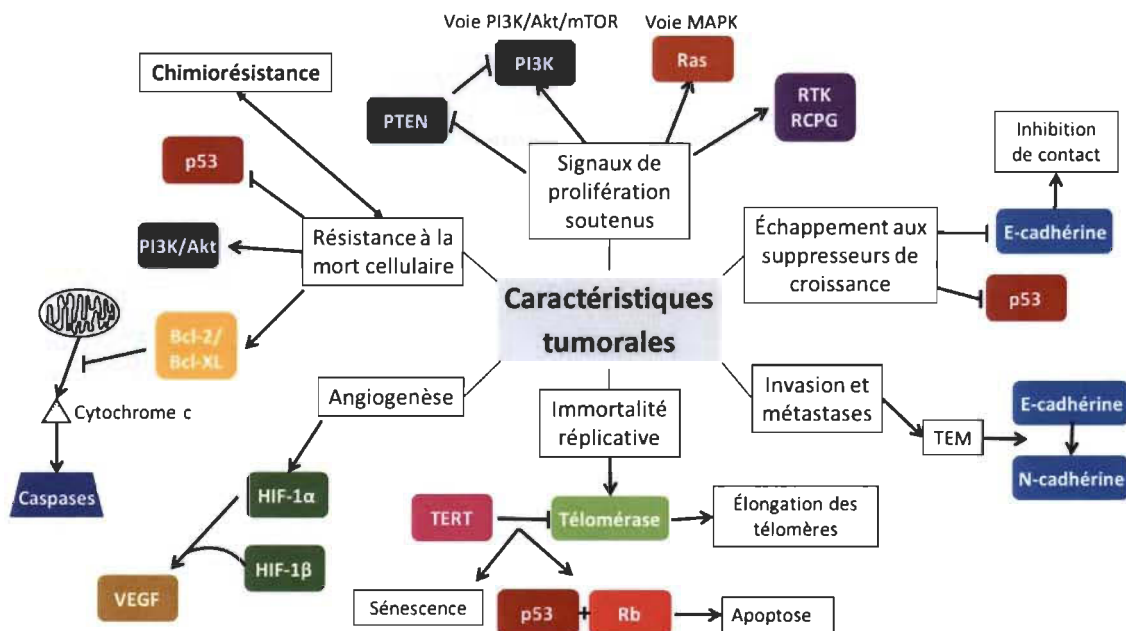


Figure 1.6 Les grandes caractéristiques tumorales et les principales voies associées.

Selon Hanahan D. et R.A. Weinberg., 2011, les cellules cancéreuses se définissent par un ensemble de caractéristiques dont les six principales sont représentées dans les encadrés centraux; soit les signaux de prolifération soutenus, l'échappement aux suppresseurs de croissance, l'invasion et les métastases, l'immortalité répliquative, l'angiogenèse et la résistance à la mort cellulaire. Chacune d'entre elles dépend de nombreuses voies de signalisation. Les protéines clés de ces voies sont représentées par les formes de couleur. Certains processus cellulaires découlant de l'acquisition des caractéristiques par les cellules cancéreuses

sont indiqués dans les encadrés secondaires. La chimiorésistance est intimement liée aux mécanismes de résistance à la mort cellulaire. Les flèches représentent l'activation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. TEM : Transition épithéliale-mésenchymateuse.

Parmi les principales caractéristiques protumorales, on retrouve des signaux de prolifération soutenus. Normalement, les cellules reçoivent l'autorisation de croître et se diviser seulement lorsque c'est nécessaire et que les conditions dans leur environnement le permettent. Les facteurs de croissance extracellulaires se lient à leurs récepteurs membranaires, souvent des récepteurs tyrosines kinases ou couplés à une protéine G. Ceux-ci s'activent et transmettent le signal à travers les protéines effectrices intracellulaires [68]. Les cellules cancéreuses vont accroître artificiellement ce signal par la production de ligands ou l'expression augmentée des récepteurs. Par exemple, les cellules de cancer du sein activent l'expression du facteur NGF (nerve growth factor) [70]. Celui-ci est sécrété pour accroître de façon autocrine leur prolifération. Une étude a montré une forte expression du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) dans le carcinome endométrial de type séreux [71]. Un autre exemple bien connu est l'augmentation du récepteur HER2 dans le cancer du sein [72]. Dans d'autres cas, les cellules tumorales vont plutôt devenir indépendantes des facteurs de croissance en mutant le récepteur, qui sera alors activé même en l'absence de ligand. Ce phénomène a été démontré dans HER2 et ER α (estrogen receptor α) [72, 73]. Dans plusieurs cancers, on retrouve des mutations de gain de fonction qui suractivent des voies majeures de la prolifération cellulaire. Parmi celles-ci, on retrouve la voie des MAPK où la protéine Ras est mutée et la voie PI3K/Akt/mTOR où la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) est fréquemment mutée ce qui la rend constitutivement active [49, 74]. Il arrive que ce soit plutôt les inhibiteurs de ces voies qui contiennent des mutations délétères, comme c'est le cas pour PTEN (phosphatase and tensin-homologue deleted on chromosome 10) qui bloque la voie PI3K/Akt/mTOR [75]. Ces mécanismes font en sorte qu'il est beaucoup plus difficile de bloquer la croissance tumorale puisque les cellules ne répondent plus aux signaux de leur environnement.

En plus d'augmenter la prolifération, les cellules cancéreuses développent des mécanismes pour bloquer les suppresseurs de croissance. Ceux-ci inhibent la croissance ou le cycle cellulaire lorsqu'il n'y a plus d'espace à combler par le phénomène d'inhibition de contact. Il se produit lorsque des protéines transmembranaires d'adhésion, comme la E-cadhérine, et de signalisation captent les signaux d'encombrement provenant des cellules voisines [76]. Des mutations dans certains suppresseurs de tumeurs régulant l'inhibition de contact permettent aux cellules cancéreuses d'empiéter sur les tissus sains [68]. Des mutations inactivatrices sont également très fréquentes dans la protéine p53, le gardien du génome, qui bloque le cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN ou de stress [77]. Étant donné que les cellules cancéreuses contiennent un taux élevé de mutations et de modifications dans leur métabolisme qui occasionnent des stress cellulaires, elles ont avantage à muter p53 pour proliférer. Cela leur permet, par le fait même, de résister aux thérapies induisant des dommages à l'ADN comme le cisplatine.

Une autre caractéristique majeure dans la progression tumorale est l'activation du processus d'invasion et de métastases. Les cellules cancéreuses dérèglent leur signalisation interne pour changer leur phénotype, souvent épithélial, à travers la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM). Les cellules cancéreuses acquièrent ainsi un plus grand potentiel migratoire. La TEM se produit normalement lors de réparation de blessures. Elle est habituellement caractérisée par une perte des protéines d'adhésion épithéliales au profit de celles mésenchymateuses ; un exemple important est la substitution de la E-cadhérine pour la N-cadhérine [78, 79]. Les cellules tumorales exploitent cette capacité pour progresser dans les tissus environnants pour atteindre les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces systèmes propagent les cellules cancéreuses dans le corps. Elles n'ont donc qu'à migrer à travers les parois des vaisseaux pour atteindre les organes éloignés et y former une nouvelle tumeur [68]. La présence de métastases rend un cancer plus difficile à traiter. Cela nécessite des traitements systémiques provoquant plus d'effets secondaires. De plus, les tumeurs secondaires peuvent évoluer différemment de la tumeur primaire, et donc acquérir des mécanismes de résistance variés [68]. Ensuite, la TEM rend les cellules cancéreuses moins sensibles

à l'induction de l'apoptose [78]. En effet, les cellules entrant en TEM ne prolifèrent plus et perdent l'expression de protéines épithéliales ciblées en thérapie, donc elles perdent leur sensibilité à beaucoup d'agents chimiothérapeutiques misant sur ces caractéristiques [18]. D'ailleurs, la TEM permettrait la résistance au paclitaxel dans le cancer de l'ovaire [80].

Pour former une tumeur croissant sans arrêt, les cellules doivent également acquérir l'immortalité répliative. Les cellules normales possèdent un potentiel de divisions limité, attribué à la longueur de leur télomère. Les télomères sont une séquence d'ADN non codant répétée qui protège les extrémités des chromosomes contre la dégradation et la fusion [81, 82]. À chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent et ne se régénèrent pas, sauf dans les cellules souches. Lorsque la cellule somatique atteint une longueur minimale de télomères, elle entre en sénescence ou meurt via une réponse médiée par p53 et Rb (retinoblastoma protein). La sénescence est un état dans lequel la cellule est viable donc fonctionnelle, mais elle ne se divise plus. Les cellules cancéreuses sont immortalisées lorsqu'elles réactivent l'expression de la télomérase, l'enzyme responsable de l'élongation des télomères [68]. La télomérase est exprimée normalement dans les cellules souches ou précurseurs. Or, elle ne l'est plus dans les cellules somatiques après la naissance. Ce serait dû à l'inhibition de l'expression de la protéine TERT (telomerase reverse transcriptase) qui forme un complexe avec la télomérase [81, 82].

Les cellules cancéreuses activent également l'angiogenèse. Il s'agit du processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, essentiel durant l'embryogenèse et la réparation des tissus lors d'une blessure. L'angiogenèse permet à la tumeur de s'approvisionner en nutriments et en oxygène [68]. Elle est régulée par le VEGF sécrété, entre autres, par les cellules cancéreuses en situation de stress. La croissance rapide d'une tumeur cause de l'hypoxie, un taux anormalement bas en oxygène dans les tissus. Ce stress cellulaire induit la stabilisation de HIF-1 α et sa dimérisation avec HIF-1 β [83]. Ce facteur de transcription active ensuite la production de VEGF [84]. L'angiogenèse contribue surtout à la progression tumorale plutôt qu'à son apparition.

Une autre caractéristique du cancer, particulièrement problématique quand il est question de thérapie, est la résistance à la mort cellulaire. Il existe plusieurs types de morts cellulaires, mais les thérapies visent majoritairement à induire l'apoptose. Il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire programmée, aussi décrit comme un suicide cellulaire. Il est médié par des signaux extra- et intracellulaires qui culminent en l'activation des caspases (Figure 1.5). Ces protéases clivent de nombreux composants cellulaires pour les inhiber et permettre la fragmentation de la cellule. Les débris sont ensuite assimilés et détruits par les cellules phagocytes du système immunitaire [55, 68, 85]. La famille des protéines Bcl-2 constitue d'importants régulateurs positifs et négatifs de l'apoptose intrinsèque. Les membres inhibiteurs, tels que Bcl-2 et Bcl-XL, empêchent la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie qui active les caspases. Les tumeurs augmentent l'expression ou l'activité de ces protéines, ou inhibent les activateurs de l'apoptose. Les mutations fréquentes dans p53 empêchent l'activation de la réponse proapoptotique aux stress, par exemple [86]. On le constate dans les lignées cellulaires de cancer ovarien [87]. La voie PI3K/Akt est souvent suractivée dans les cancers pour favoriser la survie cellulaire. Lorsque cette capacité des cellules cancéreuses leur permet de résister à l'apoptose induite par la chimiothérapie, on parle de chimiorésistance.

En bref, la plupart des caractéristiques tumorales ont été ciblées dans le combat contre le cancer ovarien, mais l'instabilité génomique, l'angiogenèse et les signaux de prolifération semblent les plus prometteurs [58]. Dans le cancer de l'endomètre, ce serait également l'instabilité génomique ainsi que la prolifération soutenue et la résistance à la mort cellulaire qui prédominent [88]. Enfin, les propriétés sont toutes inter-reliées ; elles s'influencent les unes les autres pour favoriser le développement de la tumeur. Par exemple, l'angiogenèse, en augmentant l'apport de nutriments, accroît la prolifération et, en produisant des vaisseaux sanguins intra-tumoraux, elle facilite la formation de métastases [2, 79]. De plus, les cellules cancéreuses génèrent elles-mêmes des conditions de stress, comme les dommages à l'ADN, le manque de nutriments et le stress oxydant. Cela les force à s'adapter ce qui accroît leur capacité à résister aux thérapies anticancéreuses.

1.2.3 Chimiorésistance

La chimiorésistance est l'ensemble des mécanismes moléculaires intrinsèques ou acquis par les cellules cancéreuses pour bloquer l'effet de la chimiothérapie que ce soit l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort. Les tumeurs peuvent donc être résistantes à cause de mutations et de modifications dans leur équilibre homéostatique avant même d'être en contact avec un traitement. Plus le cancer est avancé en stade lors du diagnostic, plus ce phénomène de résistance est fréquent. C'est, entre autres, ce qui peut expliquer le taux élevé de chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire. Dans les autres cas, la chimiorésistance se développe par l'adaptation des tumeurs aux stress générés par la chimiothérapie, dont il était question précédemment. Le cancer endométrial présente plus souvent ce type de chimiorésistance [26]. On reconnaît plusieurs mécanismes de chimiorésistance. Les plus importants seront abordés ci-dessous.

Les cellules cancéreuses peuvent réagir directement en fonction de l'identité du traitement en modifiant leur interaction avec la molécule ou sa cible. Plus précisément, les cellules cancéreuses accroissent leur métabolisme pour éliminer plus efficacement certains médicaments comme des anti-métabolites et les taxanes [49, 89]. L'expression ou l'activité des enzymes responsables de leur dégradation est augmentée. Dans le cas du cisplatine, la molécule est modifiée pour l'inactiver par son interaction avec un groupement thiol provenant habituellement du glutathion [60]. Ce mécanisme est utilisé pour neutraliser plusieurs traitements de chimiothérapie constitués de molécules hautement réactives. Les cellules vont également changer la localisation de la molécule thérapeutique pour l'empêcher d'agir sur sa cible comme l'ADN, par exemple. Elle peut être séquestrée dans un compartiment cellulaire, tel qu'une vésicule acide, pour être ensuite sécrétée hors de la cellule [48]. Certaines pompes protéiques vont également expulser le traitement hors de la cellule comme MDR1 (multidrug resistance protein 1) grâce à l'énergie fournie par l'ATP (adénosine triphosphate) [90].

Ensuite, les cellules cancéreuses peuvent induire des mutations dans la protéine ciblée par le traitement pour acquérir la chimiorésistance. Ce mécanisme est observé lors

de l'utilisation d'anti-métabolites, comme le 5-fluorouracil et les anti-folates, ainsi que certains inhibiteurs du fuseau mitotique, ce qui peut diminuer l'affinité du médicament pour sa cible [49]. La localisation de la cible peut aussi être altérée. Dans ce cas précis, la machinerie d'export nucléaire est mise à l'œuvre pour expulser rapidement la cible du noyau de la cellule [91]. Dans différents cancers, la protéine CRM-1 (chromosome region maintenance 1) est surexprimée pour exporter plus efficacement les topoisomérases. Leur inhibition chimiothérapeutique devient donc inefficace puisqu'elle n'induit plus de dommages à l'ADN [91].

De nombreux médicaments sont conçus pour provoquer des dommages à l'ADN. Or, les cellules normales possèdent des systèmes pour remédier à ces dommages. C'est un des nombreux mécanismes qui restreint grandement l'apparition de tumeurs suite aux mutations et aux erreurs de réplication de l'ADN durant la division cellulaire. Dans le cas de la chimiothérapie, le type de réponse aux dommages dépend de leur étendue ainsi que de leur cause. Celle-ci peut être le blocage de la fourche de réplication, la liaison d'une molécule étrangère au brin d'ADN ou le remplacement d'un nucléotide par un anti-métabolite. Pour résister à ces dommages, les cellules cancéreuses suractivent les voies de réparation de l'ADN. Dans le cancer du poumon par exemple, les protéines ERK3 (extracellular signal-regulated kinase 3) et TDP2 (Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2) sont suractivée et surexprimée respectivement [92]. Elles permettent la réparation des dommages associés aux inhibiteurs de la topoisomérase II. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides est activé suite à la formation d'adduits sur un brin d'ADN par un agent alkylant. Il permet de remplacer les bases altérées. C'est le cas pour le cisplatine qui induit la surexpression de la protéine ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) [61, 93, 94]. Lors de ce type de dommage, la cellule peut également enclencher une voie particulière de réplication de l'ADN. La polymérase recrutée est capable de passer par-dessus un adduit, contrairement aux ADN polymérases répliquatives habituelles. Il faut également prendre en compte que l'environnement tumoral et la prolifération rapide des cellules provoquent un taux élevé de mutations ce qui devrait déclencher l'apoptose.

Pour résister à ces dommages, les cellules cancéreuses dérégulent donc aussi leurs voies apoptotiques en faveur des signaux de survie.

Un des mécanismes de chimiorésistance les plus communs est l'altération des voies régulatrices de l'apoptose. En effet, les mutations qui empêchent les cellules cancéreuses de mourir par les mécanismes naturels du corps leur confèrent aussi un avantage face à la chimiothérapie. Il y a plusieurs modifications qui suractivent ou augmentent l'expression des inhibiteurs de l'apoptose. Dans les cancers gynécologiques, on retrouve XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un inhibiteur stérique des caspases, dont l'expression est fortement augmentée pour résister au cisplatine [95, 96]. La voie extrinsèque de l'apoptose est aussi inhibée, entre autres, par la surexpression des inhibiteurs de la voie Fas/FasL [40]. Le FasL se lie à son récepteur transmembranaire Fas pour activer le complexe DISC (death inducing signalling complex) à l'intérieur de la cellule. Celui-ci permet la libération de la forme active des caspases 8 et 10. Cette voie peut être inhibée directement à l'intérieur de la cellule ou dans le milieu extracellulaire par la sécrétion de sFas [97]. Il s'agit d'une forme tronquée du FasL qui est soluble. Celui-ci ne peut activer efficacement le récepteur Fas. Il monopolise donc le récepteur pour empêcher son activation. À l'inverse, certains activateurs de l'apoptose sont réprimés. Les caspases elles-mêmes sont mutées à divers points pour les inhiber [98]. Enfin, les voies de survie cellulaire sont fortement suractivées pour contrecarrer les signaux proapoptotiques. C'est le cas pour les voies MAPK et PI3K/Akt, en plus leur rôle dans la prolifération tumorale. La protéine Akt est majeure dans la chimiorésistance, entre autres, en réponse au cisplatine.

1.2.4 Voie PI3K/Akt

1.2.4.1 Régulation physiologique de la voie PI3K/Akt

Akt est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la progression tumorale à travers ses nombreuses cibles dans la prolifération, la survie (l'inhibition de l'apoptose), le métabolisme, la synthèse protéique, la migration et l'angiogenèse [75, 99-102].

Cette protéine est normalement activée par des facteurs de croissance extracellulaires qui se lient aux récepteurs tyrosines kinases ou, dans certains cas, couplés à une protéine G [101]. La Figure 1.7 résume les principaux acteurs dans la régulation de la voie Akt. Les activateurs les plus connus de cette voie incluent l'insuline qui indique un environnement favorable à la croissance cellulaire [103, 104]. L'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) est aussi un fort activateur d'Akt [105]. La liaison du facteur de croissance induit l'autophosphorylation des dimères composant le récepteur tyrosine kinase (RTK). IRS-1 (insulin-receptor substrate-1) est recrutée ce qui permet la liaison de PI3K au récepteur et l'activation de sa sous-unité catalytique, p110 [101, 106]. Celle-ci phosphoryle le PIP₂ (phosphatidylinositol diphosphate) membranaire en PIP₃ (phosphatidylinositol triphosphate). Le PIP₃ forme un motif de recrutement pour Akt via son domaine PH (pleckstrin homology). Ensuite, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), lui aussi recruté par un domaine PH, phosphoryle Akt sur la thréonine 308 (thr308). mTORC2 (mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2) phosphoryle la sérine 473 (ser473) d'Akt ce qui complète son activation dans la majorité des cas [105, 107]. Certaines autres kinases peuvent phosphoryler la ser473, telles que la DNA-PK (DNA-dependant protein kinase) qui répond aux dommages à l'ADN, la MAPKAPK-2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2) et ILK (integrin-linked kinase) [105, 108, 109]. La kinase IKK ϵ (I κ B kinase ϵ), impliquée dans la transformation cancéreuse, et son homologue TBK1 (TANK-binding kinase 1) phosphorylent Akt sur ses deux sites principaux de façon dépendante de l'activité de la PI3K [110]. Enfin, une étude a démontré que PDK1 phosphoryle la thréonine 34 au niveau du domaine PH d'Akt. Cette modification facilite sa dissociation de la membrane cytoplasmique et lui permet d'atteindre ses cibles cytosoliques [111]. Toutefois, pour maintenir l'homéostasie de la cellule, Akt ne peut être continuellement actif.

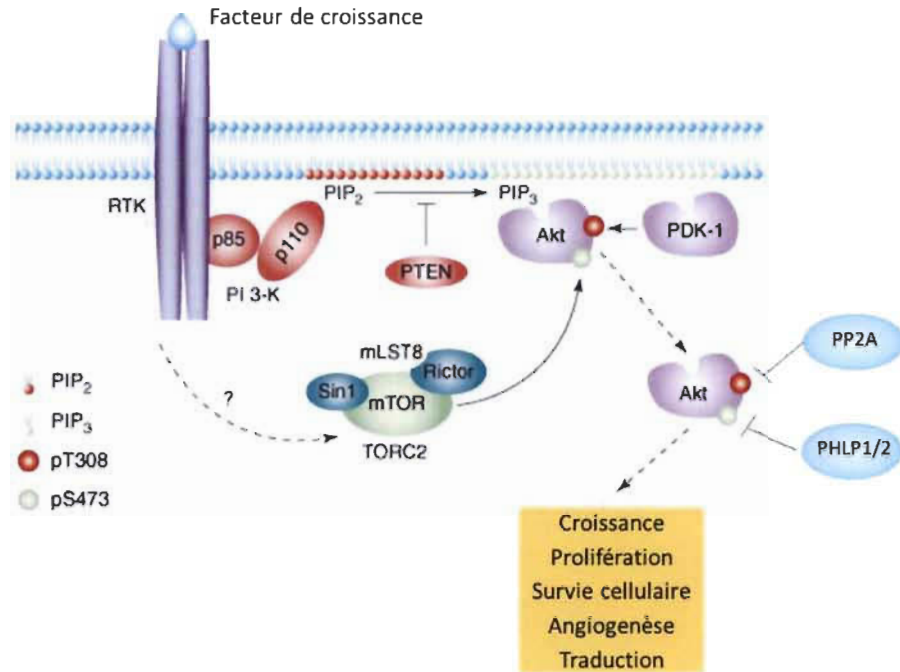


Figure 1.7 Activation de la voie Akt.

La voie Akt est d'abord activée par l'association d'un facteur de croissance à un récepteur tyrosine kinase (RTK) à la surface de la cellule. Celui s'active par transphosphorylation. Il permet le recrutement de la PI3K qui phosphoryle le PIP₂ en PIP₃. Celui-ci permet le recrutement à la membrane cytoplasmique d'Akt et PDK1. Ce dernier phosphoryle Akt sur la thréonine 308 (pT308). mTORC2 phosphoryle Akt sur la sérine 473 (pS473). PP2A et PHLPP1/2 déphosphorylent la thréonine 308 et la sérine 473 respectivement, tandis que PTEN déphosphoryle le PIP₃ en PIP₂ pour inactiver la voie. Une fois activé, Akt phosphoryle de nombreuses cibles pour favoriser la prolifération, la croissance, la traduction, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Les flèches représentent l'activation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. Adaptée de Toker, A., 2008.

En l'absence de signal, Akt est normalement inactif dans le cytosol. Sa signalisation est bloquée à plusieurs niveaux (Figure 1.7). La phosphatase PTEN reconvertit le PIP₃ en PIP₂ pour empêcher le recrutement d'Akt à la membrane [102]. PP2A (protein phosphatase 2A) et PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) sont responsables de la déphosphorylation de la thr308 et la ser473 respectivement [112-114]. Il existe des boucles de rétro-inhibition où une protéine activée par Akt peut l'inhiber en retour pour contrôler le niveau du signal produit par

Akt. mTORC1 est activé par Akt et, en retour, il inhibe l'expression d'IRS-1 [115]. Il semble également qu'une fois activée par mTORC1, la S6 kinase phosphoryle IRS-1 pour provoquer sa dégradation [116]. Néanmoins, la phosphorylation de la thr308 et la ser473 constitue un pivot déterminant dans la régulation d'Akt, mais ce ne sont pas les seules.

Akt est régulée par d'autres modifications post-traductionnelles diverses ayant un rôle activateur ou inhibiteur selon leur nature et leur position [117, 118]. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 1.3. Parmi les autres sites activateurs les mieux caractérisés, on retrouve la phosphorylation constitutive sur la thréonine 450 produite par mTORC2 [105, 119]. L'ajout d'un phosphate sur la sérine 124 aurait pour rôle de stabiliser la protéine après sa synthèse. Ces deux phosphorylations mises ensemble constitueraient une première étape vers l'activation de la kinase. Une équipe a aussi observé une phosphorylation conjointe au niveau de la sérine 477 et la thréonine 479 [120]. Selon cette étude, ces modifications faciliteraient la phosphorylation de la ser473 et augmenteraient l'activité d'Akt. Elles seraient médiées par le complexe Cdk2/CyclineA dans la progression du cycle cellulaire. En fonction du contexte cellulaire, elles pourraient aussi être amenées par mTORC2 et DNA-PK selon leur démonstration *in vitro*. Ensuite, la phosphorylation des thréonines, en position 315 et 326, serait essentielle à l'activité kinase d'Akt *in vitro* [121]. Celle-ci serait produite par la kinase Src. Akt serait aussi phosphorylé au niveau de la sérine 176 par Ack1 (activated Cdc42-associated tyrosine kinase 1) en réponse aux RTKs activés par les facteurs de croissance, mais indépendamment du recrutement de la PI3K [122]. Il existe un autre type de modification post-traductionnelle qui favorise l'activation d'Akt : l'ubiquitination. L'ubiquitine est une petite protéine servant à marquer d'autres protéines par liaison covalente pour leur dégradation ou, dans certains cas, pour changer leur localisation intracellulaire [123]. Les lysines 8 et 14 d'Akt seraient ubiquitinées via la lysine 63 pour induire son recrutement à la membrane cytoplasmique [123-125]. Cette ubiquitination serait produite par la ligase E3 TRAF6 pour faciliter l'activation d'Akt. La même équipe a démontré que la phosphorylation de la thr308 induite par la chimiothérapie était en partie dépendante de l'expression de TRAF6 dans les fibroblastes embryonnaires de

souris. La SUMOylation serait aussi impliquée dans la régulation d'Akt. Il s'agit d'une modification moins bien caractérisée, puisqu'elle est connue depuis peu, mais similaire à l'ubiquitination. Celle-ci a été observée sur la lysine 276 par Ubc9 [126]. Elle contribuerait au rôle d'Akt dans la progression du cycle cellulaire.

Tableau 1.3
Principales modifications post-traductionnelles d'Akt

Type de modification	Position	Enzyme	Effet
Phosphorylation	Ser473/thr308	PDK1/mTORC2	Activation complète
	Ser124/thr450	?/mTORC2	Stabilisation
	Ser477/thr479	CDK2, mTORC2, DNA-PK	Phosphorylation ser473
	Tyr315/tyr326	Src	Activation
	Tyr176	Ack1	Activation indépendante de PI3K
Ubiquitination (lys63)	Lys8/lys14	TRAF6	Recrutement à la membrane
SUMOylation	Lys276	Ubc9	Transition G ₁ /S [126]
Ubiquitination (lys48)	Lys284	MULAN	Dégradation au protéasome
Acétylation	Lys14/20	P300, PCAF	Diminution du recrutement à la membrane
Glycosylation	Diverse	Divers	Blocage de la phosphorylation

Les modifications activatrices sont indiquées en vert et les modifications inhibitrices en rouge.

Certaines modifications post-traductionnelles d'Akt vont plutôt bloquer son activation ou provoquer sa dégradation. Par exemple, l'ubiquitination de sa lysine 284 liée par la lysine 48 de l'ubiquitine marque Akt pour la dégradation au protéasome [127]. Plusieurs ligases E3 ont été reconnues comme pouvant cibler Akt de cette façon, telles que MULAN et BRCA1 [128]. Des études ont montré qu'Akt était marqué pour la dégradation au protéasome seulement après sa phosphorylation [129, 130]. Dans l'une

d'elles, la suppression de la ligase E3 CHIP (C-terminal Hsp70-interacting protein) par siARN stabilisait la protéine Akt, tandis que le blocage de sa phosphorylation diminuait son ubiquitination [129]. Il s'agirait donc d'un mécanisme de rétro-inhibition pour équilibrer la signalisation d'Akt. La kinase peut aussi être inhibée plus en amont en empêchant son recrutement à la membrane cytoplasmique. En effet, l'acétylation de certaines lysines dans le domaine PH semble inhiber son interaction avec le PIP₃ [119]. Ce type de modification post-traductionnelle est régulé par un équilibre entre les histones acétyltransférases et les histones déacétylases. p300 et PCAF (p300/CBP-associated factor) acétylent Akt tandis que SIRT1 déacétyle la kinase [119, 131]. Finalement, Akt peut être glycosylé sur plusieurs résidus, souvent des sérines ou des thréonines, à la position même d'un site de phosphorylation ou à proximité [117, 119]. Cela aurait pour effet d'inhiber Akt en empêchant sa phosphorylation. En résumé, la protéine Akt peut subir diverses modifications post-traductionnelles pour moduler finement son activité. Néanmoins, la phosphorylation est la principale, ce qui a pour effet de l'activer.

Akt peut aussi être régulé au niveau transcriptionnel par le biais de son promoteur. Toutefois, on en connaît encore très peu sur les facteurs de transcription responsables de l'expression du gène *Akt*. Une équipe a démontré que la voie JAK/STAT (Janus protein tyrosine kinase/Signal transducer and activator of transcription) était importante dans l'activation du gène *Akt* en réponse aux espèces réactives d'oxygènes [132]. Celles-ci étaient générées par un traitement de cisplatine. Suite à l'activation de la kinase JAK2, le facteur de transcription STAT3 s'associait au promoteur d'Akt pour l'activer. Cela favoriserait la survie cellulaire et donc, dans ce cas-ci, la chimiorésistance.

1.2.4.2 Rôle physiologique d'Akt

De nombreuses études mécanistiques sur les fonctions d'Akt ont appuyé son implication dans la tumorigénèse. D'ailleurs, la majorité des études permettant de mieux comprendre son fonctionnement ont été conduites sur des modèles de cancer, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Parmi les principales fonctions d'Akt, on retrouve son implication

dans la croissance et la prolifération. Plus particulièrement, il permet la progression du cycle cellulaire en phosphorylant les suppresseurs de tumeur p21 et p27 pour les inhiber [133, 134]. P21 inhibe les complexes Cdk4,6/CyclineD et Cdk2/CyclineE pour arrêter le cycle cellulaire en G₁/S et G₂/M respectivement. P21 est majoritairement activé par p53 en réponse aux dommages à l'ADN. P27 inhibe également le complexe Cdk4/CyclineD. Les deux suppresseurs de tumeurs sont donc inhibés par la phosphorylation produite par Akt.

Un des rôles les mieux caractérisés d'Akt est dans l'inhibition de l'apoptose. Il agit à travers de nombreuses cibles tel que démontré dans la Figure 1.8. Akt active les médiateurs de la survie cellulaire tels que MDM2 (mouse double minute 2). Lorsque phosphorylé, MDM2 est transloqué au noyau pour ubiquitiner p53 [135]. Ce dernier est ensuite dégradé au protéasome ce qui l'empêche d'activer l'apoptose. Akt va aussi phosphoryler la protéine Bad (Bcl-2 associated death promoter) ce qui provoque sa dimérisation avec 14-3-3, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 [136]. Ainsi, Bad ne permet plus l'activation de l'apoptose mitochondriale [137]. NF- κ B (nuclear factor- κ B) est un facteur de transcription régulant l'inflammation et la réponse aux stress cellulaires. Akt régule indirectement son activité en phosphorylant IKK (I κ B kinase) [138]. Celui-ci phosphoryle I κ B (inhibitor of NF- κ B) pour libérer NF- κ B qu'il séquestre au cytosol. Ce dernier peut donc transloquer au noyau pour activer l'expression de ses gènes cibles impliqués dans l'inhibition de l'apoptose. Pour agir directement dans la voie de l'apoptose, Akt cible également la pro-caspase-9 [139]. Il s'agit de la forme inactive de la caspase-9, clivée durant l'apoptose intrinsèque. L'étude en question propose que sa phosphorylation sur la ser196 entrave son clivage et donc son activation. Cela réduirait fortement l'apoptose. Toutefois, la conséquence exacte de cette phosphorylation sur le fonctionnement de la caspase-9 n'est pas encore connue.

Akt inhiberait la gluconéogenèse dans le foie [140]. Ensuite, l'impact d'Akt dans la prolifération passe par l'augmentation du métabolisme énergétique de la cellule [143]. Ce dernier est étroitement lié à la traduction puisqu'elle doit se faire en présence d'énergie. D'ailleurs, Akt régule directement la traduction via l'activation de mTORC1 [144] (Figure 1.10). Akt phosphoryle TSC1/2 pour les inhiber. Ces derniers sont responsables de l'inhibition de mTORC1. Une fois activé, mTORC1 peut phosphoryler ses diverses cibles pour activer la traduction, dont 4E-BP1 (eIF4-binding protein 1) et S6K. 4E-BP1 relâche alors son inhibition sur eIF4E qui enclenche la traduction. S6K permet aussi l'activation du processus. Par l'intermédiaire d'Akt, la traduction est en accord avec la croissance cellulaire et la prolifération [145].

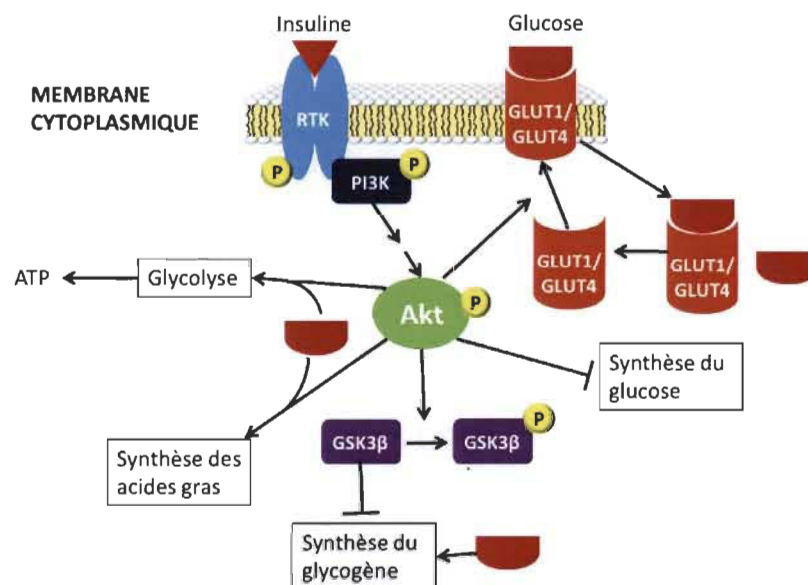


Figure 1.9 Implication d'Akt dans la régulation du métabolisme du glucose.

En présence de glucose, Akt est activé par la liaison de l'insuline au récepteur tyrosine kinase qui active PI3K. Akt induit la translocation à la membrane des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4. Ceux-ci permettent l'entrée du glucose dans la cellule. Akt inhibe la synthèse de glucose et active la glycolyse et la synthèse des acides gras dans lesquelles entre le glucose. Il active la synthèse de glycogène, dans laquelle entre le glucose, par la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β . Les protéines sont représentées par les formes de couleurs. Les processus cellulaires déclenchés par ces protéines sont indiqués dans les encadrés. Les flèches représentent l'activation d'une voie de signalisation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. P : phosphorylation, RTK : récepteur tyrosine kinase.

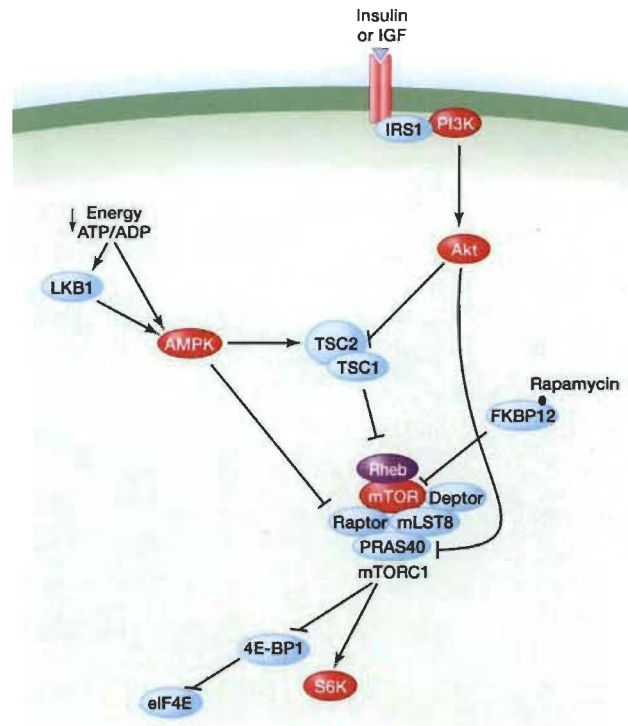


Figure 1.10 Rôle d'Akt dans l'activation de la traduction par mTORC1.

Une fois activé par les facteurs de croissance (IGF) ou l'insuline et PI3K, Akt phosphoryle TSC1/2 et PRAS40, une sous-unité du complexe mTORC1, pour lever leur effet inhibiteur sur mTORC1. Ce dernier phosphoryle 4E-BP pour l'inhiber et S6K pour l'activer permettant ainsi l'initiation de la traduction. Le processus dépendant de la disponibilité d'énergie sous forme d'ATP par l'intermédiaire de AMPK. Les flèches représentent activation d'une voie de signalisation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. Tirée de Laplante M. et D.M. Sabatini, 2009.

Les nombreuses fonctions d'Akt sont directement en lien avec les caractéristiques du cancer. En fait, il est impliqué dans l'angiogenèse par la transcription du gène codant pour le VEGF [146]. Dans ce contexte, le processus est activé d'abord par le récepteur EGFR jusqu'à l'activation d'Akt qui permet la synthèse et la stabilisation de HIF-1 α . VEGF stimule ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins grâce à une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Ce dernier processus est aussi régulé en partie par Akt [147]. Selon certaines études, il contribuerait à la réorganisation du cytosquelette permettant aux cellules de se déformer pour migrer. Le rôle précis d'Akt dans les voies de signalisation de la motilité cellulaire reste mal compris. Il semble y avoir des effets contraires d'un tissu à l'autre [100]. Cela serait en

partie dû aux différences de fonctionnalité entre les trois isoformes d'Akt dont il sera question ultérieurement. Néanmoins, la suppression ou l'inhibition d'Akt *in vitro* entrave la migration des cellules cancéreuses [148-150].

La protéine Akt est activée à la membrane cytoplasmique et phosphoryle majoritairement des cibles cytosoliques. Or, certaines de ses cibles sont nucléaires et doivent être phosphorylées par Akt pour transloquer au cytosol. Plusieurs démonstrations de la présence d'Akt actif au noyau ont été publiées [151-153]. Cela lui permet de jouer son rôle protumoral à travers la progression du cycle cellulaire, entre autres. En effet, en phosphorylant p21 et p27 nucléaires, Akt induit leur export du noyau, les empêchant ainsi d'inhiber le cycle cellulaire [134, 154]. De plus, ces deux protéines semblent posséder une activité procancéreuse au cytosol. P21 pourrait inhiber l'apoptose [32, 155]. En fait, sa phosphorylation par Akt semble avoir des effets contradictoires en fonction du résidu ciblé [156]. P27, pour sa part, favoriserait la motilité cellulaire en régulant le cytosquelette d'actine. Ensuite, certaines des cibles nucléaires d'Akt contribuent à l'inhibition de l'apoptose (Figure 1.8). Akt phosphoryle le facteur de transcription nucléaire FOXO-1 (forkhead box protein O-1) pour l'envoyer au cytosol où il est séquestré par 14-3-3 [157]. FOXO-1 n'est donc plus en mesure d'activer l'expression des protéines proapoptotiques qui en dépendent. Plus spécifique au noyau, Akt agit au niveau de l'ADN, dans les mécanismes de réparation [158]. De plus, il induit l'activation du co-activateur de la transcription p300. Suite à la transcription, la kinase collabore aussi à l'export de certains ARNm dont le produit est impliqué dans la prolifération. Bref, Akt favorise la progression tumorale également par sa présence au noyau.

Malgré la littérature sur les rôles anti-apoptotiques d'Akt dans le noyau, certaines équipes ont démontré un effet plutôt proapoptotique. D'un côté, il régulerait la progression du cycle cellulaire via Cdk2 (Figure 1.11) [159]. Au cours de la transition entre la phase S et G₂/M, Akt est activé pour entrer au noyau. Il phosphorylerait directement Cdk2 qui serait alors transloqué au cytosol, mais de façon transitoire seulement. De l'autre côté, les auteurs ont montré que l'activation constitutive d'Akt par

la chimiothérapie promouvait la localisation nucléaire soutenue de la kinase *in vitro*. Ce phénomène semble mener à la séquestration cytosolique de Cdk2 et à l'apoptose. Une autre étude a démontré que la localisation nucléaire d'Akt sensibilisait les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par l'apoptine [160]. L'apoptine est une toxine virale induisant la mort spécifiquement dans les cellules cancéreuses [161]. Ils proposent que la molécule augmente l'import nucléaire d'Akt pour favoriser l'induction de l'apoptose. D'un point de vue plus clinique, la présence d'Akt phosphorylé dans le noyau des cellules tumorales corrélait avec un meilleur taux de survie chez les patientes atteintes du cancer du sein ER α [162]. Celui-ci augmenterait la sensibilité aux thérapies anti-estrogéniques. En somme, il y a clairement une dualité concernant l'impact de la forme active d'Akt dans le noyau des cellules normales et cancéreuses [163].

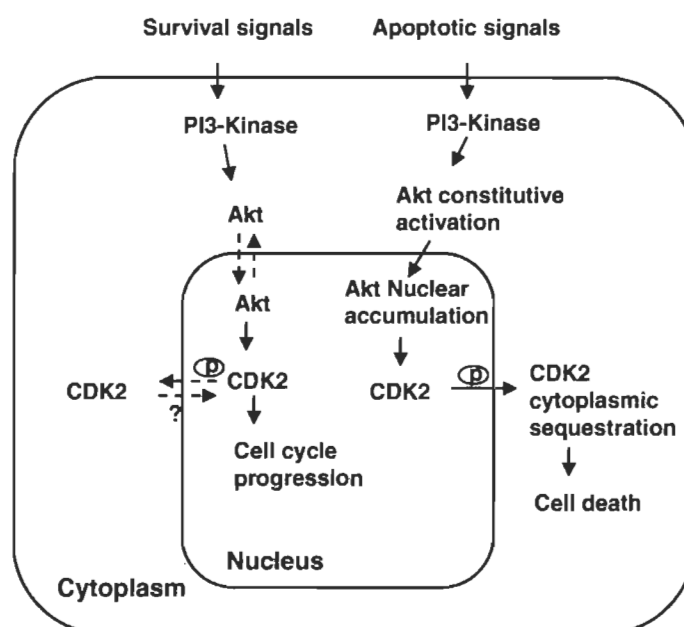


Figure 1.11 Rôle proapoptotique nucléaire d'Akt par l'intermédiaire de Cdk2.

Dans un environnement cellulaire normal, les signaux de survie activent Akt pour l'envoyer au noyau phosphoryler Cdk2. Ce dernier est transitoirement expulsé au cytosol pour permettre la progression du cycle cellulaire. Dans un environnement de stress cellulaire, Akt serait constitutivement actif ce qui provoquerait la phosphorylation constitutive de Cdk2 et sa séquestration au cytosol. Ce mécanisme serait responsable de l'induction de l'apoptose. Les flèches pleines représentent la progression d'une voie de signalisation. Les flèches pointillées représentent les va-et-vient d'une protéine entre le cytosol et le noyau. P : phosphorylation. Tirée de Maddika, S. *et al.*, 2008.

1.2.4.3 Les isoformes d'Akt

La majorité des études portant sur la kinase Akt ont été faites sur Akt1 (PKB α). Or, il existe deux autres isoformes à cette protéine, soit Akt2 (PKB β) et Akt3 (PKB γ). Leur structure est très similaire puisque les principaux domaines et sites de phosphorylation sont conservés entre les isoformes. Toutefois, les positions des résidus clés diffèrent légèrement (Figure 1.12). Ils partagent un domaine PH spécifique à l'interaction avec le PIP₃ à la membrane à leur extrémité amino-terminale [164]. Cette liaison provoque un changement de conformation d'Akt ce qui libère l'accès aux sites de phosphorylation [165]. Le domaine catalytique, ou domaine kinase, est responsable de l'interaction avec les substrats et du transfert du phosphate sur ceux-ci [106]. Il est formé de deux hélices α entourant une boucle d'activation. Celle-ci contient la thr308 (thr309 sur Akt2 et thr305 sur Akt3) dont la phosphorylation facilite l'accès des substrats au site catalytique [166]. En carboxy-terminal, les trois isoformes d'Akt possèdent un domaine de régulation sous la forme d'un motif hydrophobe, caractéristique des kinases de la famille AGC dont font partie également PKA et PKC [106]. Ce domaine contient la ser473 (ser474 sur Akt2 et 472 sur Akt3). Ces principaux domaines sont séparés par un *linker* en hélice α dont le rôle reste inconnu et un *turn motif* contenant la thr450 impliquée dans la stabilisation de la protéine [112].

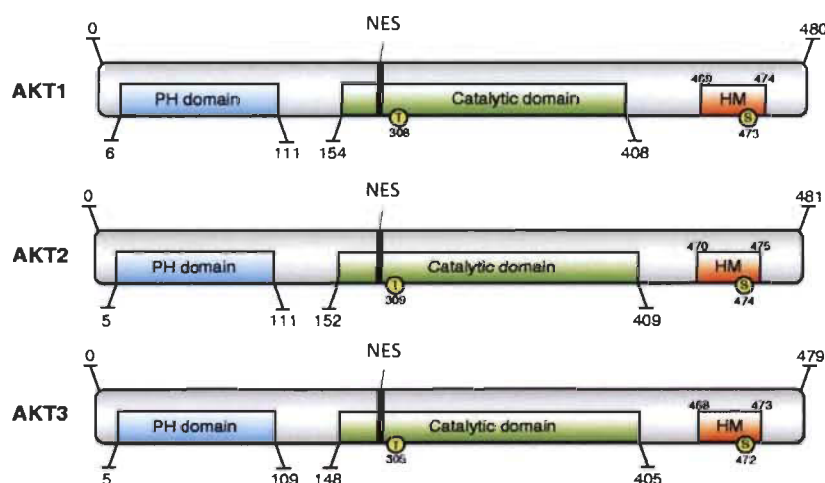


Figure 1.12 Structure des isoformes d'Akt.

Akt1, Akt2 et Akt3 possèdent les mêmes domaines principaux, soit le domaine PH (pleckstrin homology), catalytique et le motif hydrophobe

(HM). Les positions en acides aminés des domaines et des principaux sites de phosphorylation (S et T) sont indiquées. Ils possèdent tous une séquence NES (nuclear export signal) permettant l'interaction avec CRM-1 dans le domaine catalytique. S : sérine, T : thréonine. Adaptée de Fabi, F. et E. Asselin, 2014.

À l'intérieur même du domaine catalytique, il y a une séquence consensus pour l'interaction avec la machinerie d'export nucléaire, le signal d'export nucléaire (NES). Il s'agit d'une courte séquence riche en leucine suivant le patron $xLxxLxLx$ où x représente n'importe quel acide aminé [152, 167]. Elle a été d'abord localisée dans la séquence d'Akt par comparaison avec une séquence NES contenue dans d'autres protéines étant exportées du noyau, telles que RanBP1. Les auteurs de l'étude ont identifié cette séquence NES dans les trois isoformes d'Akt. Ils ont confirmé son rôle en mutant les leucines clés et en inhibant l'export nucléaire par la leptomycine B (LMB), faisant en sorte qu'Akt soit séquestré au noyau. La LMB inhibe spécifiquement la protéine CRM-1 (chromosome region maintenance-1), membre d'un complexe d'export nucléaire, qui se fixe à la séquence NES identifiée dans les isoformes d'Akt [168]. Le rôle de la protéine CRM-1 sera abordé plus en détail ultérieurement. Cette séquence permettrait donc aux trois isoformes d'Akt d'être exportés du noyau par CRM-1.

De par leur structure très similaire, les isoformes d'Akt ont de nombreuses fonctions redondantes, particulièrement au niveau de la survie et la prolifération cellulaire [169]. Plusieurs expériences de *knock-out* chez la souris soulignent cette redondance. La perte d'un seul isoforme d'Akt n'est pas létale. Toutefois, celle-ci a des conséquences non négligeables sur le développement normal des souris. Les animaux déficients pour Akt1 sont plus petits et plus sensibles à la mort [170, 171]. Plusieurs organes présentent un plus haut taux de cellules apoptotiques. De plus, la spermatogenèse est défectueuse et la croissance est retardée tout au long de leur vie. Une équipe a démontré l'importance d'Akt1 dans la réponse aux dommages à l'ADN médiée par DNA-PK [108]. Les modèles murins *in vitro* (fibroblastes embryonnaires de souris; MEFs) et *in vivo* déficients pour Akt1 exposés à des rayons gamma entraînent en apoptose plus sévèrement. Cet isoforme est donc particulièrement important dans la croissance *in utero* et la survie cellulaire. La perte combinée d'Akt1 et d'Akt2 ou Akt3

révèle l'importance d'Akt1 dans le développement d'un organisme [172, 173]. En effet, les souris doublement déficientes meurent au stade embryonnaire ou très tôt après la naissance, tandis que les souris ne possédant que l'isoforme Akt1 sont viables, mais ont une croissance ralentie [174]. Elles présentent un déficit métabolique associé à Akt2 et quelques défauts de développement pouvant être associés à Akt3. Les souris *knock-out* pour Akt2 seulement développent une résistance à l'insuline et un syndrome similaire au diabète de type II [175, 176]. Il s'en suit une diminution de la sécrétion d'insuline à cause de l'épuisement du pancréas. Ces souris sont également plus petites, comme celles déficientes pour Akt1. De plus, elles présentent une lipoatrophie, c'est-à-dire une perte du tissu adipeux. Dans les adipocytes, Akt2 semble davantage recruté qu'Akt1 à la membrane en réponse à l'insuline ce qui permettrait le recrutement de GLUT4 [103]. Akt2 serait donc spécialisé dans le métabolisme du glucose et le maintien du tissu adipeux et des îlots du pancréas. Enfin, contrairement aux deux premiers isoformes, Akt3 est exprimé seulement dans certains tissus. C'est grâce aux *knock-out* chez les souris que son rôle fondamental dans le système nerveux a pu être établi. Les animaux, quoique viables, avaient un cerveau de taille réduite et une sensibilité accrue des cellules neuronales à l'apoptose [177, 178]. De plus, la signalisation de mTORC1, dépendante d'Akt, était diminuée. Akt3 est également exprimé dans les reins, le cœur, les testicules, les poumons et les muscles squelettiques où son effet est plus évident lors de la perte de deux isoformes d'Akt combinée [173, 174, 179]. En plus de la redondance fonctionnelle entre les trois isoformes d'Akt, chacun possède donc ses spécialités nécessaires au bon développement d'un organisme.

Le rôle spécialisé des isoformes d'Akt ne peut s'expliquer qu'en partie par leur distribution dans les tissus. En fait, ils n'ont pas tous la même localisation intracellulaire. Un article publié par Santi et collaborateurs décrit la distribution intracellulaire de chaque isoforme dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et embryonnaires [180]. Toutefois, aucune étude ne semble démontrer la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt dans les tissus *in vivo*. Les expérimentations d'immunofluorescence et d'immunobuvardage ont permis de conclure qu'Akt1 était généralement exprimé au cytosol de même qu'Akt2 [180]. Ce dernier co-localisait aussi avec des marqueurs de la

mitochondrie. Cela pourrait expliquer en partie son implication dans le métabolisme du glucose puisque la mitochondrie est centrale dans l'homéostasie énergétique. Akt3, pour sa part, était davantage détecté au noyau et à la membrane nucléaire. Toutefois, les différentes études utilisant les mêmes lignées cellulaires ne s'entendent pas sur la présence ou non d'Akt3 [148, 180-182]. Cela pourrait être dû à des méthodes de détection dont la sensibilité et la spécificité vis-à-vis cet isoforme varient. La localisation de chaque isoforme ne se trouvait pas affectée par la suppression partielle d'un autre isoforme ni par leur activation [180]. La localisation différentielle des isoformes d'Akt pourrait directement influencer leur régulation et leur rôle.

1.2.5 Transport cytosol-noyau

1.2.5.1 Export nucléaire : CRM-1

La protéine CRM-1, aussi retrouvée sous le nom de XPO-1 (exportin-1), fait partie d'un complexe d'export nucléaire interagissant avec certaines nucléoporines, les composantes du pore nucléaire [183]. Elle a été d'abord identifiée dans un mutant de levure *Schizosaccharomyces pombe* sensible à la température [184]. Les auteurs ont identifié la séquence mutée et l'on clonée pour produire la protéine CRM-1 *in vitro* et confirmer son premier rôle dans le maintien de la structure des chromosomes. Les études subséquentes ont démontré le rôle essentiel de CRM-1 dans l'organisation des chromosomes durant la mitose par sa présence au niveau du kinétochore [183]. CRM-1 était principalement détecté au noyau ainsi qu'à l'enveloppe nucléaire.

C'est près de dix ans après sa découverte que la fonction de CRM-1 dans l'export nucléaire a été décrite [167, 185, 186]. Ce mécanisme conservé à travers les espèces est basé sur un gradient de RanGTP/GDP (Ran guanine tri/diphosphate) qui force sa sortie au cytosol à travers le pore nucléaire [183]. Le processus est schématisé à la Figure 1.13. CRM-1 s'associe d'abord avec RanGTP, en plus forte concentration au noyau, ce qui induit un changement de conformation révélant son site de liaison à la séquence NES. Ensuite, il lie la séquence NES de la protéine cargo. Toutefois, celle-ci

doit souvent avoir été démasquée par une modification post-traductionnelle ou l'interaction avec un cofacteur [187]. Le complexe protéique formé de CRM-1, RanGTP et le cargo contenant un NES peut être exporté au cytosol. Ce transport est rendu possible grâce à l'interaction de CRM-1 avec les nucléoporines cytosoliques CAN/Nup214 et Nup88 [188, 189]. Au cytosol, RanBP1 s'associe avec CRM-1 ce qui provoque le relargage du cargo. Avec l'aide de RanGAP (RanGTPase Activating Protein), le GTP est hydrolysé en GDP et CRM-1 est libéré pour retourner au noyau. CRM-1 est donc recyclé pour un autre cycle d'export nucléaire.

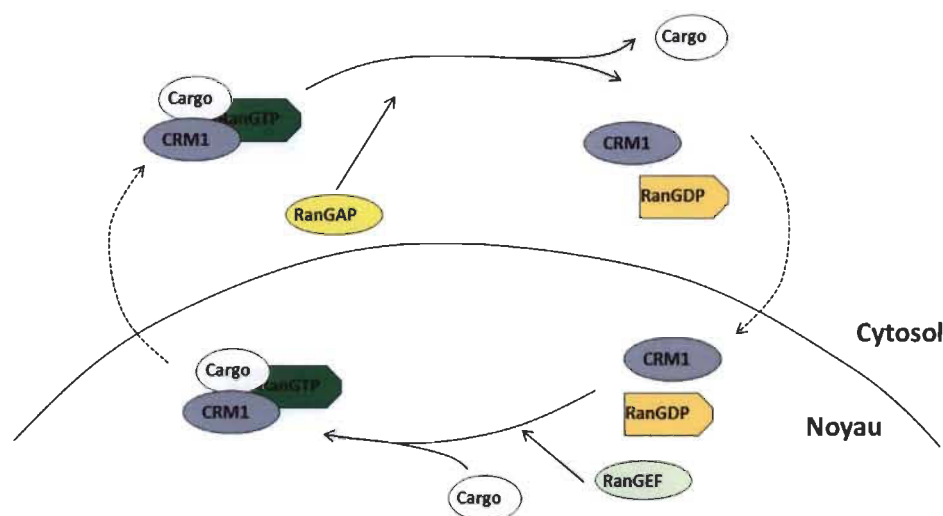


Figure 1.13 Mécanisme d'export nucléaire médié par CRM-1.

Au noyau, CRM-1 s'associe avec le RanGTP et son cargo contenant un signal d'export nucléaire. Il est exporté à cause du gradient de GTP/GDP. Après l'hydrolyse du GTP avec l'aide de RanGAP, CRM-1 retourne au noyau. Le RanGTP est reconstitué par la RanGEF. Les protéines sont représentées par les formes de couleurs. Les flèches représentent la progression de la voie de transport. Réalisée par Fabi, F.

La séquence riche en leucine a d'abord été identifiée dans la protéine virale Rev. L'export de Rev, via sa séquence NES, par le complexe CRM-1/RanGTP a été démontré dans les oocytes de *Xenopus* [167, 185]. Ces équipes ont montré l'interaction directe entre CRM-1 et le NES ainsi que son inhibition par la leptomycine B. La démonstration du rôle de CRM-1 dans l'export nucléaire a aussi été faite avec le NES de I κ B α sauvage ou muté au niveau des leucines importantes [186]. Une autre de ces équipes a confirmé

la fonction de CRM-1 à travers l'export de la protéine Dsk-1 contenant aussi un NES [167]. Cette fonction était toujours inhibée par la LMB.

Le mécanisme d'export de CRM-1 a été décrit à l'aide de diverses protéines contenant un NES riche en leucines classiques. Or, CRM-1 est également responsable de l'export de nombreux suppresseurs de tumeurs régulés par Akt [91, 135] (Figure 1.8). Le gardien du génome p53 en est un bon exemple. Celui-ci doit être importé au noyau pour réguler la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose [190]. Dans les cellules cancéreuses entre autres, il est exporté par CRM-1 suite à son ubiquitination par MDM2. P53 est donc dégradé au cytosol. Cette conclusion a été confirmée par l'inhibition de CRM-1 qui induit la séquestration nucléaire de p53 [191]. Certains facteurs de transcription FOXO ayant des effets similaires à p53 sont aussi exportés par CRM-1 via l'activité d'Akt et de PI3K [192]. Les protéines p21 et p27 seraient exportées au cytosol par l'intermédiaire de CRM-1 [91]. Le NES de p21 a d'abord été découvert par analogie de séquence avec le NES riche en leucine de Rev [193]. En inhibant CRM-1 par la LMB ou des mutations dans les NES, les deux inhibiteurs des cyclines pouvaient à nouveau s'accumuler au noyau pour bloquer le cycle cellulaire [91]. Directement parmi les composantes du cycle cellulaire, certaines cyclines seraient régulées par CRM-1. La cycline B1 qui forme un complexe avec Cdk1 est retrouvée majoritairement au cytosol [194]. Toutefois, elle doit être envoyée au noyau de façon transitoire pour permettre la progression de la mitose. Sa sortie est donc médiée par CRM-1. Les auteurs l'ont démontré par l'identification de la séquence NES, l'utilisation d'un NES compétiteur ainsi que l'effet inhibiteur de la LMB.

CRM-1 exporte également des cibles nucléaires de molécules de chimiothérapie. Parmi les mieux connues, on retrouve les Topoisomérases I et II [91]. Tel que discuté précédemment, elles gèrent l'organisation de l'ADN. Elles résident donc de façon permanente au noyau. Particulièrement dans les cellules cancéreuses, qui peuvent surexprimer CRM-1, les topoisomérases sont exportées au cytosol pour résister aux dommages causés par la doxorubicine. En effet, des expériences d'immunobuvardage et d'immunofluorescence, suite à l'inhibition pharmacologique de CRM-1, ont montré

qu'il était essentiel pour la présence des topoisomérases au cytosol [191]. De plus, il a été démontré que la surexpression de CRM-1 indiquait un mauvais pronostic pour plusieurs cancers incluant celui de l'ovaire [183, 195]. Elle corrélait aussi avec un stade et un grade élevé dans ces cancers.

CRM-1 est donc devenu une cible thérapeutique pour plusieurs cancers. Pour la recherche en laboratoire, la leptomycine B est fréquemment utilisée [183]. La molécule a été extraite de *Streptomyces spp.* Il s'agissait initialement d'un antifongique ainsi que d'un antiviral. Il est reconnu qu'elle bloque la réplication du virus du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine-1) par son action sur l'export de Rev. Une équipe a produit des dérivés de la LMB qui leur ont permis d'établir la nécessité de la δ -lactone α,β -insaturée à son extrémité pour l'interaction avec CRM-1 [168]. Les auteurs ont utilisé ces variants pour analyser le mécanisme d'action exact de la LMB. En premier lieu, ils ont produit différents mutants aléatoires de CRM-1 pour identifier la région permettant cette interaction [196]. Ils ont ainsi identifié la cystéine 529 de *Saccharomyces pombe*, correspondant à la cystéine 528 chez l'humain, qui, en devenant une sérine, empêchait l'action de la LMB. Comme montré à la Figure 1.14, la δ -lactone α,β -insaturée formerait une liaison covalente avec la cystéine en question (I-III) qui est rendue irréversible par une hydrolyse de la lactone (IV-VI) [197]. La stabilité de cette liaison a été démontrée par une migration sur gel du complexe avec LMB biotinylée suivi d'une coloration à l'argent [196]. De plus, la cystéine se trouve au niveau du site de liaison au NES, donc la LMB a aussi un effet compétitif pour ce site.

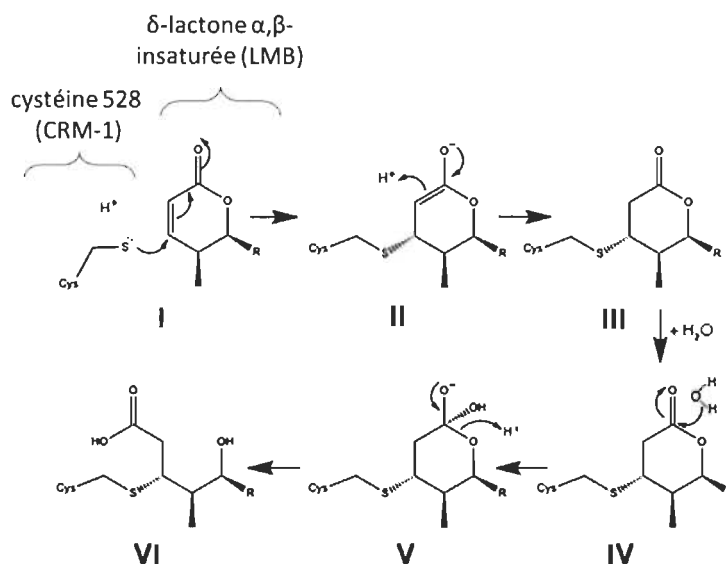


Figure 1.14 Liaison de la leptomycine B à CRM-1.

La δ -lactone α,β -insaturée de la leptomycine B (LMB) interagit avec la cystéine 528 de CRM-1 pour former une liaison covalente (I-III). La liaison est rendue irréversible par l'hydrolyse de la lactone (IV-VI). Adaptée de Sun, Q. *et al.*, 2013.

La leptomycine B inhibe efficacement l'export nucléaire de suppresseurs de tumeurs, cibles thérapeutiques et oncogènes. D'ailleurs, elle induit la séquestration nucléaire des trois isoformes d'Akt ainsi que la forme phosphorylée dans les cellules NPA de cancer thyroïdien [152]. Cette molécule ne peut toutefois pas être utilisée en clinique. En effet, une étude clinique de phase I a permis de constater que la LMB, utilisée sous le nom d'elactocin, était trop toxique pour l'humain [198]. Elle causait d'importants troubles gastro-intestinaux ainsi que des malaises. Depuis sa découverte et grâce à la compréhension du mécanisme moléculaire inhibant CRM-1, plusieurs autres composés ayant le même mode d'action ont été découverts et synthétisés [183]. Ceux-ci présentent des effets moins néfastes *in vivo*, mais malheureusement une efficacité diminuée. Une série de petites molécules inhibitrices de l'export nucléaire, en particulier, a été développée récemment sous le nom de KPT. Certaines de ces molécules sont en étude clinique actuellement. Le KPT-330 fait l'objet de plusieurs études en cours ou en préparation, entre autres pour traiter des cancers gynécologiques [52]. Leurs effets secondaires réduits pourraient être attribués au fait que la liaison avec CRM-1 à la cystéine 528 n'est pas totalement irréversible [197]. Ces molécules, en plus d'inhiber

efficacement CRM-1, augmentaient l'apoptose dans les cellules de myélome [191]. Pour sa part, le KPT-185 avait un fort effet synergique en combinaison avec trois molécules de chimiothérapie, dont la doxorubicine. L'induction accrue de l'apoptose était associée en partie à la séquestration nucléaire de la topoisomérase II et de p53. CRM-1 semble donc une cible thérapeutique à exploiter davantage. Malgré le fait que la LMB ne puisse être utilisée en clinique, elle reste un outil de recherche intéressant.

1.2.5.2 Import nucléaire : TCL-1

Après son activation à la membrane cytoplasmique, Akt doit être importé au noyau pour y atteindre ses cibles. Comme pour son export, la protéine doit être aidée pour traverser la barrière de la membrane nucléaire. Cette étape serait accomplie par TCL-1 (T-cell leukemia-1) [199, 200]. Il s'agit d'une protéine impliquée dans le transport de petites molécules telles que les rétinoïdes, les nucléotides et les acides gras. Il a aussi été démontré qu'elle stabilise le potentiel transmembranaire de la mitochondrie ainsi que favorise la prolifération et la survie cellulaire, possiblement à travers Akt [201]. TCL-1 est reconnu comme un oncogène puisqu'il serait responsable de la cancérogenèse de la leucémie à cellules T [199]. Normalement, le gène codant pour cette protéine est actif seulement dans les progéniteurs des cellules B et T, et durant le développement embryonnaire. Or, suite à un réarrangement chromosomique, ce gène est réactivé ce qui cause la transformation cancéreuse des cellules T. Celles-ci prolifèrent pour se développer en leucémie.

TCL-1 favoriserait la signalisation d'Akt par deux mécanismes. En premier lieu, il collaborerait à son activation à la membrane. Des expériences d'immunoprécipitation ont permis à plus d'une équipe de montrer l'interaction entre les protéines TCL-1 et Akt1 via son domaine PH [201, 202]. Grâce à des observations par RMN (résonance magnétique nucléaire), il semble que TCL-1 permette la dimérisation de deux molécules d'Akt pour les approcher de la membrane cytoplasmique sans nuire à leur liaison au PIP₃ [200]. Cela faciliterait leur phosphorylation au niveau de la ser473 et la thr308. Cette activation d'Akt augmenterait spécialement son activité envers GSK3 β et

Bad [201]. En second lieu, TCL-1 favoriserait la localisation nucléaire d'Akt dans certains types cellulaires [202]. Pour ce faire, les deux protéines doivent être en mesure d'interagir au cytosol pour ensuite transloquer au noyau. Toutefois, aucun signal de localisation nucléaire (NLS) n'a encore été identifié dans la séquence d'Akt. Ce mécanisme de transport permettrait à Akt de favoriser la tumorigenèse par ces cibles nucléaires.

1.2.6 Voie PI3K/Akt dans le cancer

1.2.6.1 Modulateurs en amont d'Akt

L'une des explications pour lesquelles Akt est considéré comme un oncogène consiste en de nombreuses altérations de sa voie de signalisation. Les gènes codants pour les trois isoformes d'Akt sont rarement mutés. Toutefois, les protéines sont fréquemment suractivées, un phénomène observé dans les cancers gynécologiques. Cette suractivation est majoritairement causée par des aberrations dans les modulateurs en amont d'Akt. Des altérations sont détectables dès les récepteurs transmembranaires. Plusieurs d'entre eux sont amplifiés, mutés ou surexprimés dans le cancer [74, 203]. Parmi les plus fréquents, le récepteur erbB2, ou HER2, est surexprimé dans une proportion élevée de cancers du sein [72]. Sa surexpression permet aux cellules cancéreuses de maintenir de façon prolongée le signal de prolifération et de survie. De plus, une mutation spécifique au niveau de son domaine extracellulaire fait en sorte qu'il est activé même en absence de ligand. Il peut donc activer de façon constitutive la voie Akt. HER2 serait d'ailleurs amplifié et muté aussi dans les cancers gynécologiques [30, 88]. D'autres récepteurs tyrosines kinases subissent des mutations ou amplifications tels que EGFR et PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) [75]. FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) est muté dans environ 13 % des cancers endométriaux [204]. L'altération des récepteurs seule n'est pas suffisante pour provoquer la transformation cancéreuse des cellules, mais elle contribue aux caractéristiques du cancer par la suractivation d'Akt.

En progressant dans la voie, les altérations de la PI3K sont plus fréquentes que celles des récepteurs dans les cancers gynécologiques. Le gène codant pour la sous-unité catalytique p110 α , *PIK3CA*, présente des mutations faux sens dans deux régions sensibles où le changement d'une base azotée provoque un changement de codon [74, 75, 101, 205]. Ces mutations sont suffisantes pour induire la transformation oncogénique. Celles-ci peuvent être retrouvées dans 30 à 50 % des cas de cancers endométriaux et environ 12 % des cancers ovariens. Le gène est aussi amplifié dans ces cancers. Dans les lignées de cancer ovarien, des auteurs ont pu observer jusqu'à 4 fois plus de séquences *PIK3CA* que la normale [206]. L'amplification s'accompagnait d'une plus forte transcription et activité de la PI3K. De plus, le phénomène corrélait avec un pronostic défavorable chez les femmes atteintes du cancer endométrial [207]. Moins souvent, on observe des mutations activatrices au niveau de la sous-unité régulatrice p85. Il s'agit de mutations ponctuelles qui augmenteraient l'activité de p110 α et possiblement déstabiliseraient la phosphatase PTEN. Ces nombreuses altérations ont pour effet d'activer la PI3K de façon constitutive donc indépendamment des signaux extracellulaires.

L'une des principales altérations observées dans le cancer endométrial est celle de PTEN dont les mutations occasionnent souvent une perte de la protéine [208]. Une étude basée sur des tissus cancéreux a permis de démontrer par immunohistochimie que 64 % des tumeurs perdaient la production de la protéine. D'un autre côté, seulement 43 % présentaient une altération dans la séquence du gène. Cela peut s'expliquer en partie par la régulation épigénétique de la transcription de *PTEN* [88]. Les mutations pourraient être causées en partie par l'hyperméthylation du promoteur de *MLH-1* (mutL homolog 1), dont la protéine est impliquée dans la réparation de l'ADN [209]. Cette altération épigénétique provoque une augmentation de l'instabilité génomique. En fait, il s'agirait du gène le plus souvent muté dans le cancer endométrial ainsi que nombreux autres cancers [204]. Malgré cela, la perte de PTEN semble concentrée dans les cancers endométriaux non agressifs, pour lesquels le pronostic est plus favorable [207, 210]. Il faut toutefois considérer que ce type de cancer est généralement diagnostiqué tôt et que le pronostic est plutôt favorable. La perte de PTEN serait donc un des éléments

déclencheurs d'une tumeur dans l'endomètre. En effet, des études ont montré que sa suppression dans des modèles *in vivo* conduisait presque inévitablement à l'apparition d'un cancer endométrial [211, 212]. La perte d'un seul allèle induisait majoritairement à une hyperplasie, l'étape précédent l'apparition du cancer. Dans l'ovaire, les mutations de PTEN sont moins fréquentes [213]. Cependant, on observe un taux de perte de la protéine plus élevé ce qui serait causé par des défauts au niveau de son expression. Notre équipe et d'autres ont également soulevé une régulation de PTEN dépendante de sa stabilité. En effet, la protéine XIAP semble agir comme une ubiquitine ligase pour PTEN pour induire sa dégradation au protéasome [214]. Ce mécanisme a été confirmé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Il permettrait donc la régulation d'Akt par XIAP pour inhiber l'apoptose. Il a également été démontré que PTEN était clivé par la caspase-3 dans les lignées cellulaires de cancers ovariens [215]. Ce phénomène était activé par le cisplatine, possiblement pour inhiber l'apoptose. Il s'agirait donc d'un mécanisme de chimiorésistance. La perte de PTEN induit une accumulation de PIP₃ à la membrane cytoplasmique ce qui accroît le recrutement et la phosphorylation d'Akt. De plus, elle est souvent associée à une suractivation de la PI3K.

1.2.6.2 Akt1 dans les cancers gynécologiques

Malgré le faible taux de mutation dans les isoformes d'Akt, on retrouve très souvent un ou plusieurs isoformes surexprimés ou suractivés. Ce dernier mécanisme peut être dû aux altérations de la voie classique en amont d'Akt présentées précédemment, ou à une régulation spécifique à un isoforme. De telles dérégulations d'Akt sont observées dans une grande diversité de tumeurs et les cancers gynécologiques n'y font pas exception [100]. L'expression d'Akt1 est augmentée dans près de 50 % des carcinomes pulmonaires et 40 % des cancers ovariens [216, 217]. Sun et ses collaborateurs ont démontré que l'expression d'une forme constitutivement active d'Akt1 était suffisante pour induire la transformation oncogénique et la formation de tumeur *in vivo* [217]. Il y a une dizaine d'années, une équipe a identifié une mutation ponctuelle dans Akt1 qui déclenchait aussi cette transformation [218]. Il s'agit de la substitution de l'acide glutamique en position 17 pour une lysine (E17K). Celle-ci se

située dans le domaine PH d'Akt1. Elle fait en sorte que la protéine est recrutée constitutivement à la membrane cytoplasmique sans nécessiter la présence de PIP₃. Les auteurs ont identifié cette mutation dans des échantillons de tumeurs de seins, colorectales et ovariennes. Elle a été retrouvée également dans 4 % des échantillons de cancer endométrial [219]. De plus, elle semble associée à la perte protéique de PTEN. E17K se retrouverait surtout dans les tumeurs de stades et de grades avancés. Cependant, l'étude comportait un nombre restreint de tumeurs (73). Il serait donc imprudent de généraliser ces résultats. D'autre part, la surexpression d'Akt1 peut être causée par l'amplification de son gène, comme il a été observé dans le cancer du poumon [216]. Toutefois, seulement 4 % des cas présentaient cette altération. En somme, la dérégulation d'Akt1 semble principalement attribuable à ses régulateurs protéiques.

Une fois suractivé, Akt1 favorise plusieurs processus cellulaires dont il est responsable dans un contexte physiologique. Cet isoforme serait impliqué dans les signaux de croissance et de prolifération accrus dans les cancers du poumon, de la vessie, de l'estomac et gynécologiques [169, 220-223]. Dans le cancer de l'ovaire, l'utilisation de siARN a permis de démontrer qu'Akt1 activait la traduction par l'intermédiaire de p70S6K1 et des régulateurs du cycle cellulaire [222]. Les résultats étaient très similaires pour l'inhibition d'Akt1 ou celle de la sous-unité p110 α dans la PI3K. Pour ce qui est de l'invasion et les métastases, le rôle d'Akt1 est très partagé. En fonction du type de cancer, il peut être inducteur ou inhibiteur. Dans les lignées cellulaires métastatiques de vessie, Akt1 était nécessaire à la migration et l'invasion [169]. Dans l'ovaire, le rôle pro-invasif d'Akt1 semble encore véhiculé par p70S6K1 [222]. Au contraire, dans le cancer du sein, cet isoforme supprimait la migration cellulaire par l'induction de la dégradation de plusieurs cibles et la phosphorylation de la palladine, une protéine du cytosquelette [224]. Enfin, diverses expérimentations de suppression d'Akt1 accroissaient significativement le niveau basal d'apoptose dans des lignées cellulaires de poumon, vessie et d'estomac [169, 220, 221]. Cela démontre l'importance de l'isoforme dans la survie cellulaire malgré les signaux proapoptotiques présents dans l'environnement tumoral.

Akt1 joue aussi un rôle fondamental dans l'inhibition de l'apoptose induite par la chimiothérapie. Il permet, entre autres, la résistance au cisplatine dans les cancers du poumon et de l'estomac [169, 221]. Dans ce dernier, la délétion d'Akt1 augmentait la sensibilité au cisplatine de lignées cellulaires et de xénogreffes. Par contre, le médicament augmentait la phosphorylation d'Akt dans les cellules sensibles exprimant toujours Akt1, possiblement comme une tentative de survie. Dans le cas du cancer endométrial, peu d'études ont été menées. Notre équipe a utilisé différents modèles cellulaires modifiés à l'aide de shARNs et de vecteurs de surexpression pour comprendre le rôle spécifique de chaque isoforme [223]. La perte d'Akt1 augmentait les cellules apoptotiques d'environ 50 % suite au traitement de cisplatine ce qui fut observé par marquage des noyaux au Hoechst. Ce résultat a été appuyé par cytométrie de flux et immunobuvardage sur des marqueurs d'apoptose. La démonstration inverse, par la surexpression d'Akt1 constitutivement actif, a également confirmé ce mécanisme de chimiorésistance. Enfin, la perte d'Akt1 diminuait la survie des cellules cancéreuses endométriales en réponse à la doxorubicine et au paclitaxel aussi utilisés en clinique.

1.2.6.3 Akt2 dans les cancers gynécologiques

L'implication d'Akt2 dans les processus tumoraux a été moins étudiée que celle d'Akt1 et elle est un peu plus restreinte. Cet isoforme est quand même altéré dans les cancers du sein, de l'ovaire, du poumon, du pancréas et colorectal [100]. Toutefois, son rôle oncogénique dans l'endomètre est incertain. La surexpression d'Akt2 a été démontrée dans plus de 40 % des échantillons de tumeurs pulmonaires ce qui pourrait être attribué à une polysomie fréquente du chromosome 19 [216]. Il est aussi surexprimé dans le cancer du pancréas associé à une amplification de son gène dans la même proportion [75]. Pour le cancer de l'ovaire, des biopsies et des lignées cellulaires ont été analysées par immunobuvardage de type southern [225, 226]. Akt2 est normalement presque indétectable au niveau de l'épithélium de surface de l'ovaire [227]. Malgré cela, environ 12 % des tumeurs et 20 % des lignées présentaient une amplification du gène Akt2, mais cela n'expliquait pas totalement la surexpression de la protéine. Elle pouvait être 30 à 45 fois plus élevée que les cellules normales par rapport à une amplification du

gène de 10 à 15 fois [226]. Les altérations d'Akt2 étaient retrouvées majoritairement dans les tumeurs de grade et de stade avancé, suggérant qu'il contribue à l'agressivité tumorale dans l'ovaire. Akt2 a été retrouvé amplifié également dans le cancer du sein et colorectal [101]. Il est très rarement muté. Néanmoins, des mutations ponctuelles ont été caractérisées dans quelques échantillons de tumeurs endométriales, mais leur effet reste inconnu [228].

Comme son homologue Akt1, Akt2 est impliqué dans plusieurs processus tumoraux. La délétion de l'isoforme dans des lignées de cancer pulmonaire a montré son importance d'abord dans la progression du cycle cellulaire [169, 229]. Celle-ci se ferait à travers la phosphorylation de Rb ce qui libère les activateurs du cycle. La perte d'Akt2 a également inhibé la croissance de xénogreffes à partir de ces mêmes lignées cellulaires pulmonaires et de lignées pancréatiques [75]. De plus, l'utilisation de siARN contre Akt2 et d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002) diminuait de près de la moitié la prolifération de lignées cellulaires ovariennes [227]. Dans cette étude, l'inhibition spécifique d'Akt1 ou d'Akt3 n'avait pas d'effet significatif. Ensuite, comme c'est le cas pour Akt1, mais de façon plus prononcée, Akt2 favoriserait la motilité cellulaire dans le cancer du poumon [148]. Des démonstrations *in vitro* indiquent que les deux isoformes réguleraient la migration et l'invasion à travers l'activation de COX-2, essentielle dans l'inflammation [229]. Des xénogreffes de cancer du pancréas ont démontré une diminution de la capacité d'invasion à cause de la délétion d'Akt2 [75]. Dans le cancer du sein, Akt2 favoriserait aussi la migration [224]. Par contre, il agirait en opposition à Akt1 en augmentant l'expression de la palladine sans la phosphoryler. Dans le cancer endométrial, notre laboratoire a démontré qu'Akt2 inhibait plutôt la migration *in vitro* [223]. Akt2 serait important aussi pour la survie cellulaire basale dans certains cancers. La délétion d'Akt2 par siARN dans des lignées pulmonaires induisait l'activation des caspases [169]. L'apoptose serait due à la perte du potentiel membranaire mitochondrial, une fonction assurée spécifiquement par Akt2. Une étude sur des cellules de cancer ovarien a montré le rôle prédominant de cet isoforme pour la réponse à l'EGF [230]. Les auteurs ont comparé plusieurs lignées exprimant ou non Akt1 et Akt2. La viabilité, analysée par MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyl tetrazolium), dépendait presque exclusivement d'Akt2. En bref, tout comme Akt1, il a une implication dans les mécanismes tumoraux de prolifération et de survie cellulaire. Akt2 se distingue surtout en favorisant la migration et donc la formation des métastases.

En plus d'augmenter l'apoptose, la perte d'Akt2 sensibilise les cellules cancéreuses au cisplatine. Dans le cancer du poumon, sa surexpression semble être un mécanisme de chimiorésistance [169]. C'est aussi le cas dans les cancers gynécologiques. Akt2 s'est avéré presque aussi important qu'Akt1 dans l'inhibition de l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules endométriales [223]. Toutefois, il semble que les deux isoformes n'agissent pas par les mêmes voies. Lors de l'exposition au cisplatine, les cellules résistantes activent PKC (protein kinase C) et Akt2, lui-même activé par PKC [231]. Akt2 activerait ensuite la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui inhibe les caspases. Ensuite, cet isoforme semble le plus important dans la résistance au cisplatine dans le cancer ovarien. Les données actuellement disponibles sont synthétisées à la Figure 1.15. Une étude a utilisé des lignées cellulaires sensibles et résistantes au cisplatine pour comparer l'effet de l'expression d'Akt2 actif et dominant négatif [232]. Les auteurs ont pu en conclure qu'Akt2 inhibait les kinases de stress JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 par la phosphorylation directe d'ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Normalement, le cisplatine devrait activer JNK et p38 pour induire l'apoptose à la mitochondrie par Bax (Bcl-2 associated X, apoptosis regulator). Selon une autre étude, dans les cellules chimiorésistantes, le cisplatine aurait pour effet d'activer Chk1 (checkpoint kinase 1) pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G₂/M [233]. Alors que dans les cellules sensibles, celles-ci n'entrent pas dans le cycle cellulaire, mais plutôt en apoptose. La surexpression d'Akt2 actif spécifiquement augmentait l'activité de Chk1 et diminuait l'apoptose en réponse au cisplatine. L'arrêt du cycle cellulaire par l'intermédiaire d'Akt2 serait donc un mécanisme de chimiorésistance. Il reste encore beaucoup de questions à répondre. Le cisplatine active JNK et p38 dans les cellules sensibles n'exprimant pas Akt2, tandis qu'il active Chk1 dans les cellules résistantes exprimant l'isoforme. Or, il a été démontré que ces protéines (JNK, p38 et Chk1) collaboraient pour bloquer le cycle cellulaire suite

au blocage de la réplication [234]. Puis, les dommages à l'ADN causés par le cisplatine pourraient y contribuer.

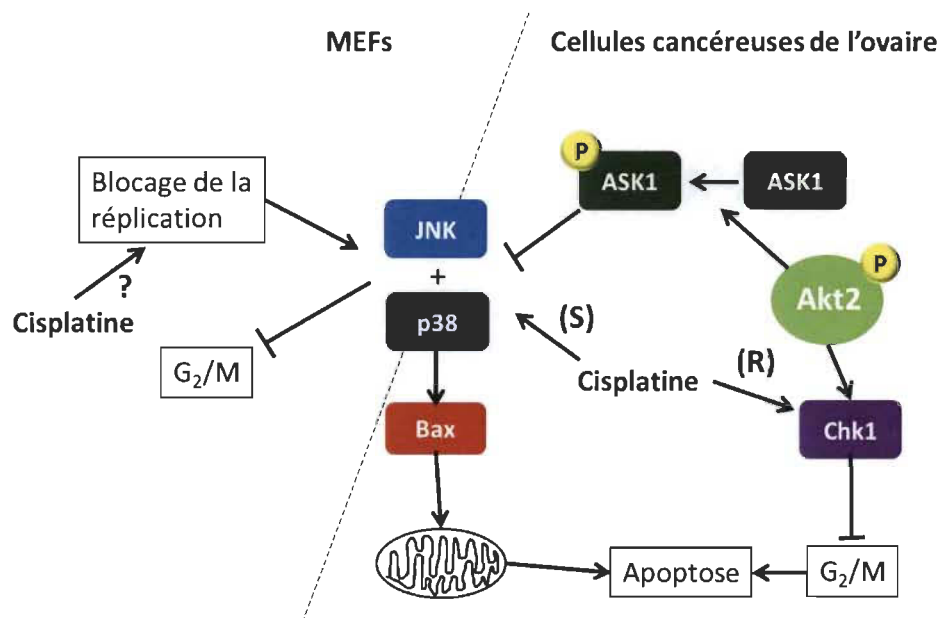


Figure 1.15 Rôle d'Akt2 dans la résistance au cisplatine.

Dans le cancer de l'ovaire (droite), le cisplatine induit l'activation des kinases de stress JNK et p38 qui activent Bax. Il déclenche l'apoptose à la mitochondrie dans les cellules sensibles au traitement (S). Dans les cellules résistantes (R), Akt2 phosphoryle ASK1 qui inactive JNK et p38. Le cisplatine et Akt2 favorisent l'activation de Chk1 qui bloque le cycle cellulaire au niveau de la transition G₂/M. Il s'agit d'un mécanisme pour empêcher l'induction de l'apoptose par le cisplatine. Dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), le blocage de la réplication de l'ADN induit l'activation de JNK et p38. Ceux-ci, même lorsque Chk1 est inactif, bloquent la transition G₂/M. Or, le cisplatine pourrait induire ce genre de blocage de la réplication (?). Les protéines sont représentées par les formes de couleurs. Les processus cellulaires déclenchés par ces protéines sont indiqués dans les encadrés. Les flèches représentent activation d'une voie de signalisation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. P : phosphorylation.

Enfin, la protéine Akt2 permet la résistance au paclitaxel dans les cancers gynécologiques et le cancer du sein [100, 223]. Il est aussi impliqué dans l'inhibition de l'apoptose induite par la doxorubicine dans l'endomètre [223]. D'une part, Akt2 augmenterait l'expression de la survivine, un inhibiteur de l'apoptose, dans le cancer ovarien [235]. D'une autre part, sa surexpression permettrait de surmonter l'arrêt du

cycle cellulaire en G₂/M provoqué par le paclitaxel [236]. En tant que poison du fuseau mitotique, il bloque la division cellulaire pour induire l'apoptose. Il semble évident qu'Akt2 régule le cycle cellulaire, particulièrement en réponse à la chimiothérapie. Toutefois, le mécanisme complet reste mal compris.

1.2.6.4 Akt3 dans les cancers gynécologiques

Akt3 a été très peu étudié dans le cancer puisqu'il est exprimé seulement dans certains tissus, et très peu dans le système reproducteur féminin. Il existe tout de même quelques données pour le cancer de l'ovaire, entre autres. Akt3 serait surexprimé dans 20 % des tumeurs primaires et plusieurs lignées cellulaires où il est constitutivement actif [181]. De plus, cet isoforme serait plus abondant sous sa forme active dans 40 à 60 % des mélanomes [237]. Il est aussi surexprimé dans le cancer du poumon dans 23 % des échantillons cliniques [216]. Ceci peut s'expliquer par une fréquente polysomie du chromosome 1. Ensuite, l'augmentation de la protéine serait due à une amplification de son gène dans l'hépatocarcinome et le glioblastome [75]. Enfin, les mutations dans Akt3 sont très rares. Une mutation ponctuelle a quand même été identifiée dans un échantillon de cancer endométrial [228].

Le fait qu'Akt3 soit plus spécialisé que les autres isoformes laisse supposer que sa surexpression est plus critique dans les processus tumoraux. D'abord, il serait nécessaire à la croissance des cellules du cancer du sein triple négatif, c'est-à-dire ne présentant pas les récepteurs aux estrogènes, à la progestérone ni HER2 [238]. En effet, la délétion d'Akt3 par shARN permettait l'augmentation de p27 en culture tridimensionnelle et en xénogreffes pour inhiber le développement tumoral. Akt3 semble aussi favoriser la progression du cycle cellulaire dans le cancer ovarien [181]. En effet, sa suppression ralentirait la transition G₂/M. Ensuite, la suractivation d'Akt3 dans les cellules tumorales disséminées dérivées de cancer pulmonaire accroîtrait leur prolifération [148]. Cette étude a pu identifier les cyclines D1 et D3 comme cibles d'Akt3. Cet isoforme est donc impliqué dans la croissance et la prolifération de certains cancers. Les auteurs ont aussi décrit le caractère migratoire accru des cellules l'exprimant. Dans les cellules du

cancer du sein, Akt3 était surexprimé suite à un traitement avec un inhibiteur d'Akt, le MK2206 [239]. Ce mécanisme rendait les cellules plus invasives par l'induction de la TEM. Dans le poumon, les isoformes d'Akt semblent jouer un rôle crucial dans la progression tumorale. Akt3 n'est pas exclu. En plus de favoriser la prolifération et l'invasion, il contribuait à la survie cellulaire [148]. Dans le cas du mélanome, c'est spécialement Akt3 qui est essentiel pour l'inhibition de l'apoptose, même en l'absence de chimiothérapie [237].

Des études récentes ont permis de révéler le rôle potentiel d'Akt3 dans la chimiorésistance. Certains micro-ARNs cibleraient Akt3 pour diminuer la prolifération, mais également pour sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par le cisplatine. Or, ils sont plus faiblement exprimés dans les lignées cellulaires résistantes au cisplatine. miR-489 a été identifié dans les cellules de cancer ovarien [182]. Dans le cancer de la prostate, une équipe a identifié miR-29b, qui limiterait aussi la migration via Akt3 [240]. Akt3 était également relié à la résistance au tamoxifène dans le cancer du sein ainsi qu'à la doxorubicine dans le cancer endométrial [100, 223].

En résumé, les mutations dans les isoformes d'Akt sont plutôt rares. Cependant, les cas de surexpression causés par d'autres altérations géniques, ou de suractivation causés par la dérégulation d'autres protéines sont très fréquents. On constate qu'Akt1 et Akt2 ont un effet redondant au niveau de la croissance et la prolifération via le contrôle du cycle cellulaire. Pour ce qui est de la migration, leur rôle est plus partagé. Souvent Akt1 l'inhibe tandis qu'Akt2 l'active. Dans certains types de cancer, les deux isoformes ont le même effet. Akt3 favorise certains processus tumoraux, mais dans une gamme plus restreinte de cancers. Du point de vue de la chimiorésistance, Akt1 et Akt2 ont un impact similaire pour la survie face au cisplatine dans le cancer endométrial. De l'autre côté, les lignées cellulaires ovariennes dépendent davantage d'Akt2 pour inhiber l'apoptose dans ce contexte. Il est clair que les isoformes d'Akt jouent un rôle essentiel dans les caractéristiques du cancer et la chimiorésistance. De plus, ils démontrent une certaine spécificité qui dépend de nombreux facteurs. Ces facteurs sont encore à approfondir pour espérer cibler les isoformes d'Akt efficacement en clinique.

1.2.7 Thérapies combinées contre la chimiorésistance

Par l'accumulation de mutations et d'altérations dans la signalisation cellulaire, les cellules cancéreuses deviennent davantage dépendantes de certaines voies. Le rôle de chaque isoforme d'Akt peut donc être encore plus crucial dans une tumeur. Pour appuyer cette hypothèse, diverses lignées cellulaires cancéreuses semblent accroître l'expression ou l'activité d'Akt en réponse au cisplatine. Dans le cancer de l'estomac, la résistance au cisplatine pourrait être attribuée plus spécifiquement à l'augmentation de la phosphorylation d'Akt1 et donc de son activité [221]. Dans une étude de notre laboratoire sur le cancer endométrial, les lignées sensibles au cisplatine présentaient une diminution du niveau d'Akt, mais une forte augmentation de sa phosphorylation, possiblement pour tenter de bloquer l'apoptose [215]. Ensuite, l'expression d'Akt3 serait augmentée par le cisplatine à travers la diminution de miR-489 dans les lignées de carcinome ovarien résistantes au médicament [182]. Enfin, ce traitement induirait l'augmentation de l'expression d'Akt, même au niveau de sa transcription, dans une lignée de cancer du côlon [241]. Dans ce cas, le cisplatine produit des espèces réactives de l'oxygène ce qui activerait le facteur de transcription STAT3. Bref, il est important de cibler les isoformes d'Akt à travers des traitements spécifiques et adaptés au phénotype de chaque tumeur.

Pour adapter chaque thérapie aux différentes tumeurs, il devient essentiel d'avoir recours à des combinaisons de traitements. Le cisplatine est utilisé en clinique depuis longtemps pour son efficacité antitumorale. Mais en considérant les informations présentées précédemment, les cellules cancéreuses ont acquis des mécanismes variés pour y résister. Il est donc de plus en plus combiné à d'autres molécules anticancéreuses. Plusieurs études ont testé son efficacité couplée à des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt, considérant la dérégulation dont elle fait l'objet en présence du cisplatine seul. Le LY294002 et la wortmannin sont des inhibiteurs bien connus de la PI3K tout comme le PI-103, qui est moins utilisé. Combinés au cisplatine, ils sensibiliseraient les cellules de mélanome et de cancer ovarien à son action proapoptotique [242, 243]. L'inhibition de mTORC2 par la rapamycine semble avoir le même effet sur les cellules de

mélanome. Différents types d'inhibiteurs d'Akt ont été développés. D'une part, la périfosine est conçue pour empêcher l'activation d'Akt donc sa phosphorylation [244]. Celle-ci a été utilisée dans une étude *in vitro* portant sur le cancer ovarien [245]. Elle bloquait la prolifération cellulaire, lorsque combinée au cisplatine. D'une autre part, le MK2206, déjà en études cliniques, inhibe plutôt l'activité d'Akt de façon allostérique [246]. Il ne peut donc pas interagir avec et phosphoryler ses cibles. La molécule a efficacement sensibilisé des cellules de cancer de la vessie, de l'ovaire et d'ostéosarcome [247-249]. Une de ces études a également montré leur efficacité sur la croissance tumorale de xénogreffes [247]. Un dérivé du MK2206, le MK2206 2HCl, inhibe spécifiquement Akt3. Celui-ci a été suffisant pour sensibiliser des lignées cellulaires de cancer ovarien au cisplatine [182]. Enfin, une étude clinique de phase II a évalué l'efficacité du MK2206 chez des patientes atteintes de cancers gynécologiques résistants aux platines [250]. Les conclusions indiquent que quatre patientes sur cinq montraient une stabilisation du cancer après seulement quatre semaines de traitement. Malheureusement, les effets secondaires étaient considérables. Il reste que la combinaison de thérapies avec le cisplatine semble un bon moyen pour améliorer son efficacité anti-cancéreuse.

Tel que discuté précédemment, CRM-1 est aussi une cible thérapeutique étudiée dans plusieurs cancers. Cette protéine contrôle la localisation, et par le fait même l'activité, des nombreux suppresseurs de tumeur. Certains d'entre eux sont impliqués dans l'induction de l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire par le cisplatine. Une équipe s'est donc intéressée à l'effet combiné de l'inhibition de CRM-1 et du cisplatine. Les auteurs ont utilisé le KPT-330, une molécule ayant le même mécanisme, mais moins toxique que la leptomycine B [251]. Ils ont observé un effet synergique sur la mort de plusieurs lignées cellulaires de cancer du poumon. Avec la médecine personnalisée, la chimiothérapie se dirige de plus en plus vers des combinaisons de traitements. Toutefois, nombreux mécanismes moléculaires doivent être approfondis pour arriver à une thérapie gagnante.

1.3 Intérêt de la recherche

Les données actuelles nous montrent qu'Akt est impliqué dans plusieurs processus tumoraux dans les cancers gynécologiques. On commence à comprendre un peu mieux comment chaque isoforme joue un rôle spécifique dans divers cancers. La régulation qui distingue leurs cibles et leurs fonctions spécialisées est toutefois mal comprise. Le niveau d'expression de chaque isoforme dans un tissu donné peut y contribuer, comme Akt3 semble l'indiquer. Ensuite, la séquence d'acides aminés est très semblable entre les isoformes. Les résidus phosphorylés et les domaines protéiques sont conservés. La structure de chaque protéine peut donc difficilement expliquer leur spécificité de substrat qui en font des protéines à disséquer séparément. Le fait que leur gène soit sur des chromosomes différents pourrait faciliter une régulation différentielle de leur transcription. Certaines études suggèrent que la distribution intracellulaire normale entre le cytosol, le noyau, la membrane cytosolique et la mitochondrie l'expliquerait en partie. Quelques équipes ont caractérisé ces différences, mais aucune d'entre elles n'a pu vraiment l'expliquer. Il est connu qu'Akt peut être aussi transporté entre le cytosol et le noyau par l'intermédiaire de CRM-1 et TCL-1. Les éléments déclencheurs de la translocation sont inconnus. Pourtant, les isoformes possèdent des cibles dans diverses régions de la cellule qui doivent être régulées finement.

Les isoformes d'Akt semblent une cible thérapeutique de choix. Cependant, leur inhibition totale en clinique n'est pas la meilleure solution selon les études déjà réalisées. Il faut approfondir les mécanismes moléculaires autour de ces protéines piliers pour mieux sélectionner les cibles thérapeutiques propres aux cellules cancéreuses. La chimiorésistance fait partie de ces mécanismes. On sait que certains isoformes d'Akt favorisent la résistance au cisplatine plus que d'autres, et ce, en fonction du type de cancer. Cependant, le système sous-jacent est inconnu. Il semble n'y avoir aucune donnée sur l'impact de la localisation d'Akt sur la résistance à l'apoptose.

1.4 Hypothèse et objectifs

Pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie, il faut arriver à des molécules spécifiques aux cellules cancéreuses et efficaces. Pour ce faire, il est essentiel de comprendre le fonctionnement moléculaire des tumeurs. Les recherches antérieures ont prouvé l'implication des isoformes d'Akt dans la progression tumorale et la chimiorésistance. Il y a encore beaucoup de liens à faire entre la résistance au cisplatine et la régulation d'Akt. D'un côté, la localisation intracellulaire d'Akt peut être régulée par le complexe d'export nucléaire dont fait partie CRM-1. Cette dernière protéine est impliquée dans certains mécanismes de chimiorésistance. D'un autre côté, chaque isoforme d'Akt possède des fonctions qui lui sont propres et une distribution cellulaire particulière. Leur localisation pourrait donc être régulée différemment. Dans le cadre du présent mémoire, nous proposons que les cellules de cancers gynécologiques régulent la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt, et ce de façon différentielle, en réponse au cisplatine pour bloquer l'induction de l'apoptose. La découverte d'un tel mécanisme contribuerait à notre compréhension des processus de chimiorésistance.

Le présent mémoire se divise en deux principaux objectifs. Il vise, dans un premier temps, à faire une synthèse de ce qui est connu et moins bien compris actuellement dans la littérature, pour cibler les lacunes et orienter les procédures expérimentales. C'est l'objet de la revue de littérature présentée précédemment. Elle permet donc de définir notre compréhension actuelle de la régulation d'Akt dans le cancer. Il en ressort plusieurs questions, dont certaines seront abordées dans le second objectif. Dans un deuxième temps, la régulation de la kinase Akt en réponse à la chimiothérapie sera analysée, pour tenter de mieux comprendre son implication dans la chimiorésistance. La protéine pourra ainsi être plus adéquatement ciblée dans les thérapies anti-cancer en développement. Ce second objectif, traité dans le chapitre II, sera atteint à l'aide de modèles de cancer endométrial et ovarien en culture cellulaire. Pour la première partie de l'objectif, nous caractériserons la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt en contexte normal ainsi qu'en présence de chimiothérapie. Pour la deuxième partie, la sensibilité des lignées cellulaires gynécologiques au cisplatine sera évaluée pour la mettre en parallèle avec la distribution des isoformes d'Akt.

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DE LA LOCALISATION DES ISOFORMES D'AKT DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

France-Hélène Joncas, François Fabi, Pascal Adam, Sophie Parent,
Monique Cadrin et Éric Asselin.

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour être soumis prochainement en anglais dans une revue scientifique avec comité de révision.

2.1 Contribution des auteurs

En tant que première auteure, j'ai fait la grande majorité de l'expérimentation ainsi que la rédaction de l'article. Le projet est basé sur les résultats préalables de François Fabi qui a aussi contribué à cet article par certains résultats expérimentaux. Pascal Adam a également contribué à la production de résultats. Sophie Parent, en tant que professionnelle de recherche, a supervisé le travail pratique nécessaire au projet et collaboré à son bon fonctionnement en général. Monique Cadrin, Ph. D. est la codirectrice du projet. Elle a participé à la conception du projet ainsi qu'à son soutien financier. Eric Asselin, Ph. D. est le principal investigateur du projet et détient les fonds nécessaires à sa réalisation. Il a contribué à la conception des expériences et à la rédaction de l'article. Tous les auteurs de l'article sont affiliés au département de biologie médicale de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

2.2 Résumé de l'article

Les cancers gynécologiques sont principalement traités par la chimiothérapie. Toutefois, on observe un niveau élevé de chimiorésistance dans les cancers de

l'endomètre et de l'ovaire. Les cellules tumorales développent divers mécanismes pour résister à la mort cellulaire induite, entre autres, par le cisplatine. Ce médicament est communément utilisé pour traiter plusieurs cancers. Parmi ces mécanismes, il y a la suractivation de la voie Akt. Les trois isoformes d'Akt ont différentes implications dans la chimiorésistance. Akt1 et Akt2 semblent particulièrement importants dans la résistance au cisplatine dans les cancers gynécologiques. Or, les mécanismes régulant la spécificité de l'isoforme pour un médicament ou un cancer donné ne sont pas bien compris. Certaines démonstrations de la littérature indiquent que les isoformes d'Akt peuvent être transportés entre le cytosol et le noyau pour atteindre différentes cibles. Nous proposons que la localisation des isoformes d'Akt puisse être modulée en réponse au cisplatine ce qui pourrait affecter le niveau de résistance au médicament. Des lignées cellulaires de cancer endométrial et ovarien ont été traitées avec différentes doses de cisplatine et de leptomycine B, un inhibiteur de l'export nucléaire. La distribution cytosol-noyau ainsi que l'expression totale de chaque isoforme d'Akt ont été analysées par immunobuvardage de type western. L'apoptose a été mesurée par la même méthode. Les résultats indiquent que la perte d'expression d'Akt1 et Akt2 corrèle avec l'augmentation de l'apoptose induite par les deux traitements. Selon ces premiers résultats, la perte d'Akt pourrait être due à l'induction de l'apoptose. Le mécanisme exact reste à déterminer. En réponse au cisplatine, Akt1 semblait plus important au noyau tandis qu'Akt2 serait particulièrement nécessaire au cytosol. Il semble donc y avoir une régulation différentielle de la distribution intracellulaire de ces deux isoformes. Akt3 était exprimé seulement dans les lignées cellulaires chimiorésistantes, mais il n'était pas régulé par le cisplatine. Il en reste encore à comprendre sur la régulation d'Akt dans le but d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie.

2.3 Titre de l'article

Characterization of Akt isoform localization in gynecological cancer cell lines

Abstract

BACKGROUND: Endometrial and ovarian carcinomas are among the most frequent cancers in women and chemoresistance is a major hurdle in these cancers. The up-regulation of Akt pathway, a pivotal kinase in cell survival and proliferation, contributes to resistance to cisplatin-induced apoptosis. However, the specific role of each isoform (Akt1, Akt2, Akt3) in chemoresistance is still poorly understood. There are evidences that nuclear Akt could have a specific role in cell cycle progression and apoptosis. We hypothesized that cisplatin could modulate Akt isoform intracellular distribution to sensitize gynecological cancer cells to apoptosis.

METHODS: We investigated the differential localization and expression of Akt isoforms in gynecological cancer cell lines treated with cisplatin and leptomycin B (LMB), a nuclear export inhibitor, in relation with apoptosis induction.

RESULTS: Cisplatin induced an important decrease of Akt1 and Akt2 protein level. This loss of Akt isoforms correlated with increased apoptosis. Akt1 was increased in cisplatin-resistant cell lines. We used LMB to confirm whether nuclear localization of Akt directly modulates apoptosis. Apoptosis was particularly observed while cytosolic reduction of Akt2, for both molecules.

CONCLUSION: Cisplatin altered Akt isoform intracellular distribution in sensitive cancer cell lines. We propose that this new regulation mode of Akt could be involved in cisplatin sensitivity of endometrial and ovarian cancer cells. Pharmacological reduction of cytosolic Akt could become a new strategy to target this protein to overcome chemoresistance in gynecological cancers.

Introduction

Endometrial carcinoma is the fourth most frequent cancer in women [1]. The diagnosis is often early, allowing an efficient control of the tumour. The main problem with this cancer is relapses that are highly resistant to conventional chemotherapy [2]. On the other hand, ovarian carcinoma is the fifth killer cancer in women. This issue is explained by a late diagnosis. The tumours are mostly aggressive and resistant to chemotherapy [1]. So, chemoresistance is a major hurdle in both gynecological cancers. Cisplatin is commonly used to treat many cancers including endometrial and ovarian [3, 4]. This drug produces DNA damages to induce apoptotic cell death. Cancer cells acquire many resistance mechanisms to cisplatin, such as increased DNA repair or genetic alteration of apoptosis and survival signalling pathways. Among them, the PI3K/Akt pathway is often upregulated [5].

Akt, also called PKB (protein kinase B), is a serine-threonine kinase well known for its role in cell proliferation, survival and metabolism [6, 7]. It is activated when growth factors associate with a tyrosine kinase receptor. Then, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) is recruited to the plasma membrane to phosphorylate PIP₂ (phosphatidylinositol diphosphate) into PIP₃ (phosphatidylinositol triphosphate). Following this, Akt is recruited to the membrane, through its pleckstrin homology (PH) domain, allowing its phosphorylation by PDK1 on thr308 and mTORC2 on ser473 [6, 8] (See Fig. 1 in [7]). In addition to phosphorylation, Akt is regulated by numerous post-translational modifications such as acetylation, ubiquitination and SUMOylation [9, 10]. Mutations in the PI3K gene (*PIK3CA*) have been reported in endometrial and ovarian carcinomas leading to its hyperactivation and constitutive phosphorylation of Akt [11, 12]. PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) is essential for Akt inactivation by dephosphorylation of PIP₃. This tumour suppressor is frequently mutated in endometrial cancer, promoting Akt sustained activation [12, 13]. We and others demonstrated that overexpression and constitutive activation of Akt significantly contributed to cisplatin resistance in gynecological cancers [14, 15].

There are 3 Akt isoforms (Akt1, Akt2, Akt3) sharing over 80% of structural homology. They possess the same major domains and phosphorylation sites [12, 16]. Despite their redundant roles, studies in mice demonstrated specific activities for each isoform. Akt1 is expressed in most cells and is essential for *in utero* growth and cell survival [17, 18]. Akt2 regulates glucose metabolism [19, 20]. Akt3 is mainly expressed in the nervous system for brain development [21, 22]. Few studies showed that Akt isoforms have differential effects in cancer cells. Akt1 would mostly promote cell growth and proliferation but not Akt2, which promotes migration and invasion [23-25]. But the specific role of each Akt isoform in chemoresistance is still poorly understood. We demonstrated that Akt1 and Akt2 are essential for cisplatin resistance in endometrial cancer cell lines [26, 27]. Akt2 would be the main isoform promoting cisplatin resistance in ovarian cancer cells [28, 29]. We do not understand yet which signalling mechanisms are responsible for this specificity.

Once activated, Akt phosphorylates its targets that are mainly cytosolic, but few of them are nuclear. Even if there is no nuclear localization signal known for Akt, it can be translocated to the nucleus. Some authors identified TCL-1 (T-cell leukemia 1) as an oncogene that contributes to the nuclear import of Akt [30, 31]. Nuclear export of Akt is better understood. All three isoforms possess a leucine-rich nuclear export sequence (NES) following the pattern: xLxxLxLx. This sequence is similar to the NES of other proteins interacting with CRM-1 (chromosome region maintenance-1), also known as XPO-1 (exportin-1) [32]. CRM-1 is part of a complex that shuttles various cargo proteins from the nucleus to the cytosol through nuclear pores. The complex needs a cycle of RanGDP-GTP to export proteins [33, 34]. CRM-1 is then recycled to the nucleus (See Fig. 1 in [33]). Saji *et al.* [32] showed that Akt isoforms interact directly with CRM-1 through the NES and are exported in the cytosol. They confirmed this observation by inhibiting CRM-1 with leptomycin B (LMB). Treatment of NPA thyroid cancer cells with LMB induced the nuclear sequestration of all Akt isoforms [32]. There are also differences between the intracellular distributions of Akt isoforms in cancer cells. Akt1 and Akt2 are mostly cytosolic, but Akt2 is enriched in the mitochondria. Akt3 is more present in the nucleus depending on tissue types [35].

Considering this, intracellular localization of Akt could underlie its signalization and its isoform specificity.

Nuclear translocated Akt is already activated (pAkt) in most cases [30, 36]. Indeed, LMB treatment induces pAkt nuclear accumulation as well [32]. Some nuclear specific targets of Akt are known, such as FOXO transcription factors and p300. These proteins are implicated in cell cycle progression and proliferation in agreement with the cytosolic functions of Akt [36]. In contrast, a pro-apoptotic role of Akt has been recently described. Activation of Akt would sensitize cancer cells to cell death in a context of oxidative stress [30, 37]. The nuclear import of constitutively active Akt also promotes chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells [38]. Hence, Akt may have both pro- and anti-apoptotic roles but what distinguishes these roles is unclear.

The differential regulation of Akt isoforms in cancer needs more investigation. The molecular mechanisms implicated in the isoform specificity in cisplatin resistance and apoptosis are poorly understood. Little is known about how changes in Akt intracellular localization may influence chemoresistance. It is why Akt is still an anti-cancer target largely studied. We hypothesize that, in addition to its activity and expression, Akt subcellular localization may be modulated in response to cisplatin. This modulation could be differential between Akt isoforms. It could constitute a mechanism of chemoresistance.

In this article, we first investigated whether cisplatin affects the intracellular distribution of each Akt isoform in endometrial and ovarian cancer cell lines. We put emphasis on the differences between isoforms. Then, we analyzed cisplatin-induced apoptosis in relation with Akt distribution. We studied Akt localization by analyzing cytosolic and nuclear protein fractions on western blots. The apoptosis was measured with caspase-3 and PARP cleavage. Cisplatin could induce a specific sequestration of Akt isoforms in an intracellular compartment which could sensitize cancer cells to apoptosis or favour survival. So, we used leptomycin B to confirm if nuclear localization of Akt would modulate apoptosis by directly inducing its nuclear accumulation.

Our results suggest that cisplatin promotes Akt1 and Akt2 protein decrease in apoptosis-sensitive cancer cell lines whereas Akt1 level was increased in resistant cell lines. The cytosolic loss of Akt2 was correlated with apoptosis induction in endometrial and ovarian cancer cells.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Dulbecco's modified Eagle medium-F12 (DMEM-F12), bovine growth serum (BGS) and Fetal bovine serum (FBS) were purchased from HyClone (South Logan, UT, US). Gentamycin, cisplatin (cis-Diammineplatinum(II) dichloride) and leptomycin B (LMB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). Akt (#9272), Akt2 (#2964), Akt3 (#14982), pAkt(ser473) (#9271), cleaved capase-3 (#9661) and PARP (#9532) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, US). Akt1 antibody (#HPA002891) is from Sigma-Aldrich. CRM-1 (#sc-5595) and Cyclin B1 (#sc-752) antibodies are from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, US). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (#170-6515) was obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, CAN). GAPDH-HRP antibody (#ab9484) is from Abcam (Cambridge, MA, US). Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 secondary antibody (#A21206) is from Invitrogen (San Diego, CA, US). Anti- β -Actin-Peroxidase Monoclonal antibody (#A3854) is from Sigma-Aldrich.

Cell culture and treatments with cisplatin and leptomycin B

Human endometrial cancer cell line EN-1078D was a gift from Anne-Marie Mes-Masson (Université de Montréal, Montréal, QC, CAN) and were originally described in [39]. Human endometrial cancer cells KLE were purchased from ATCC (American Type Culture Collection). Human epithelial ovarian cancer cell lines A2780 and A2780CP (resistant to cisplatin) cells were a gift from Dr G. Peter Raaphorst (Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, ON, CAN) and were originally described in [40].

EN-1078D were cultured in DMEM-F12 with 10% BGS. KLE were cultured in DMEM-F12 without HEPES (Gibco; Burlington, ON, CAN) with 10% FBS. A2870 and A2780CP were cultured in DMEM-F12 with 5% BGS. Gentamycin 50 $\mu\text{g/mL}$ was added to all culture media. The cells were maintained at 37 °C with 5% CO₂. To analyze the localization of Akt isoforms, cells were treated for 24h before harvesting, with 10 μM and 20 μM cisplatin and/or 10 nM, 20 nM or 40 nM LMB.

Western blots of Akt isoforms and apoptosis markers

For subcellular fractionations, treated cells were harvested and lysed with the NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents from Thermo Fisher Scientific (Nepean, ON, CAN)) according to the manufacturer instructions. For whole cell protein analysis, cells were lysed in RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS) in presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science; Indianapolis, IN, US) followed by three freezes–thaw cycles. Proteins were analyzed by western blot as described in [41]. Equal amounts of protein extracts were resolved by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% milk in 0.06% Tween PBS. They were probed with primary antibody overnight. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1h. Detection of peroxidase activity was performed using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Fisher Scientific) as described by the manufacturer instructions using EpiChemi II Darkroom (UVP; Upland, CA, USA). The densitometry was done using ImageJ (NIH; Bethesda, MD, US). For fractionations, GAPDH was used as a loading and purity control for cytoplasmic proteins, whereas PARP was used for purity control of nuclear proteins. β -Actin was used as loading control for whole cell and nuclear fraction protein analysis.

Immunofluorescence of leptomycin B efficiency control

Cells were plated on coverslips. Once treated, they were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. They were permeabilized with 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate PBS for 5 minutes. After each following step, cells were washed 2x2 minutes in PBS. They were incubated with primary antibody against cyclin B1 or negative control IgG (Vector Laboratories; Burlington, ON, CAN) overnight at 4 °C. Cells were then incubated with fluorescent-tag-conjugated secondary antibody for 1h at room temperature. The slides were counterstained with Hoechst nuclear dye for 5 minutes and prepared with mounting medium Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific). The slides were analyzed with a Leica confocal microscope, model TCS SP8.

Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of three times. The data were subjected to 1-way ANOVA with PRISM software version 7 (GraphPad; San Diego, CA, US). Differences between experimental groups were determined by a Student Newman-Keuls posttest. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

Results

Decreased expression of Akt1 and Akt2 in presence of cisplatin

First our model cell lines were characterized for Akt isoforms basal expression and activation (Fig. 1). Two endometrial (EN-1078D and KLE) and two ovarian (A2780 and A2780CP) carcinoma cell lines were used for this study. EN-1078D and A2780 are cisplatin-sensitive where as KLE and A2780CP are cisplatin-resistant. All cell lines strongly expressed Akt1. Akt2 was differentially expressed between each cell lines. Akt3 was only expressed in cisplatin-resistant cell lines, KLE and A2780CP. All cell lines possessed at least one isoform phosphorylated (active). The literature shows that all isoforms are phosphorylated in KLE and Akt1 and Akt2 are active in A2780 [26, 42].

We already observed phosphorylation of Akt1 and Akt2 in A2780CP (unpublished data). The information on each cell line is summarized in Table 1. To contribute understanding the role of intracellular distribution of Akt isoforms in chemoresistance of gynecological cancer cells, we quantified and localized their expression following cisplatin treatment by protein analysis. Figure 2 shows subcellular and whole cell expression of Akt1 (A) and Akt2 (B) in endometrial cancer cells from western blot densitometric analysis. Both cytosolic and nuclear Akt1 were decreased in cisplatin-sensitive EN-1078D cell line. Whole cell extract (WCE) indicates that there was a loss of total expression of Akt1 in EN-1078D whereas KLE increased Akt1 total expression. In EN-1078D, the results are similar for Akt2 expression. For the cisplatin-resistant cells, Akt2 nuclear level was slightly decreased as well as the total expression (Fig. 2B), indicating a differential regulation of Akt isoforms in this cell line. Ovarian cancer cell lines were also analyzed for Akt expression and distribution which are presented in Fig. 3. When comparing cytosolic and nuclear Akt1 (A), there was a significant nuclear loss in the cisplatin-sensitive cell line A2780 corresponding to the total protein decrease. On the other hand, Akt1 total expression was increased following cisplatin treatment in A2780CP, the cisplatin-resistant counterpart. Considering Akt2 (Fig. 3B), its total expression was dramatically decreased by cisplatin treatment in A2780. This phenomenon was visible in the cytosol and the nucleus. This isoform seemed to be increased in A2780CP. The present study considered all Akt isoforms. Neither Akt3 expression nor its distribution was modulated by cisplatin treatment in our cancer cell lines (data not shown). Cisplatin-sensitive cell lines showed an important decrease of Akt1 and Akt2 total expression.

Molecular mechanisms behind the intracellular localization of Akt and its implication must be better understood. To study this problematic, we targeted the nuclear transport machinery that could regulate Akt localization. All Akt isoforms possess a conserved CRM-1-interacting NES. Besides, they are known to be modulated by leptomycin B (LMB) in some cell lines. So, this drug was used to force nuclear accumulation of Akt isoforms. LMB-treated cells were processed for protein analysis by western blots. Fig. 4 shows Akt isoforms relative expression and distribution in

endometrial cancer cell lines. EN-1078D presented a drop of cytosolic and nuclear Akt1 as well as in its whole cell expression (Fig. 4A). Such a phenomenon was seen only in the nuclear fraction of KLE. Akt2 showed a slight nuclear decrease in KLE whereas cytosolic Akt2 was also decreased in EN-1078D. The total expression strengthens this result. Finally, KLE showed a significant increase of Akt3 whole cell expression at low dose of LMB (10nM), as shown in Fig. 4C. Akt isoforms distribution in ovarian cancer cell lines following LMB treatment is presented in Fig. 5. We observed a slight decrease of Akt1 whole cell expression also seen in the nuclear fraction of A2780 (Fig. 5A). The phenomenon was similar when analyzing Akt2 whole cell expression and localization (Fig. 5B). However, Akt1 or Akt2 expression did not change in A2780CP in presence of LMB. Akt3 stayed normally expressed in A2780CP regardless of LMB dose. But this isoform could not be detected in EN-1078D or A2780. In summary, LMB decreased Akt1 and Akt2 total expression in chemosensitive cells, particularly in the endometrial cell line.

In order to better understand cancer cell response to leptomycin B, we had to validate its efficiency. First, cisplatin- and LMB-treated cancer cell lines were submitted to whole cell protein analysis of CRM-1. Results from western blot experiments are shown in Fig. S1. In endometrial cancer cells (A), CRM-1 total expression was increased by LMB as expected, according to the literature [43]. In Figure S1B showing ovarian cancer cell CRM-1 expression, such an increase was present but less pronounced. Then, cyclin B1 localization was analyzed by immunofluorescence following LMB treatment. Cyclin B1 is accumulated in the cytosol of cycling cells because of CRM-1 action [44]. So LMB treatment of our cell lines should induce a nuclear accumulation of cyclin B1. Figure S2 shows immunofluorescence staining of cyclin B1 in gynecological cancer cell lines. The protein was mainly cytosolic in the control (upper panel) and nuclear in LMB-treated cells (lower panel) as expected.

Increased apoptosis in cisplatin-sensitive cells

Cisplatin and leptomycin B are known to induce apoptosis and they both influenced Akt isoforms regulation according to previous results. Thus, we investigated if Akt expression and distribution alterations would correlate with apoptosis in our model. Gynecological cancer cell lines were treated with cisplatin or LMB and then submitted to western blot protein analysis of apoptosis markers. Endometrial cancer cell apoptosis levels are compared in Fig. 6. When treating EN-1078D, PARP as well as caspase-3 were greatly cleaved indicating a high level of apoptosis (Fig. 6A). If we compare EN-1078D and KLE in response to cisplatin, Fig. 6B shows a major difference in PARP cleavage which is almost undetectable in KLE. LMB induced much more PARP cleavage in EN-1078D than KLE according to Fig. 6C. The same analyses were made with ovarian cancer cell lines and some differences came out. First, Fig. 7A demonstrate an important PARP and caspase-3 cleavage in A2780 in response to cisplatin, whereas A2780CP did not present these apoptosis markers. Quantification of cleaved PARP (Fig. 7B) indicated a higher apoptosis level than in the endometrial lines. Finally, both ovarian cancer cell lines presented a weak PARP cleavage caused by LMB (Fig. 7C), slightly higher in A2780CP.

Combined effect of cisplatin and leptomycin B on Akt expression and apoptosis

Cisplatin and leptomycin B induce apoptosis through different mechanisms. Cisplatin directly produces DNA damages to block replication and activate intrinsic apoptosis pathway [5]. LMB inhibits specifically the nuclear export protein CRM-1 which disrupts the cell homeostasis and would activate programmed cell death [33]. Furthermore, current chemotherapy research develops many strategies based on combined treatments. Therefore, we investigated the impact of combined treatment on Akt expression and apoptosis induction. Our gynecological cancer cell lines were treated with cisplatin and LMB, then whole cell proteins were analyzed by western blot. Figure 8 shows Akt1 (A) and Akt2 (B) whole cell expression in endometrial cell lines. Combined treatment additionally decreased Akt1 level in EN-1078D. In KLE, LMB seems to cancel the effect of cisplatin on Akt1 expression. Akt2 also decreased more

importantly with the combination in the cisplatin-sensitive cell line, whereas there was no significant effect in KLE. The analysis of Akt isoforms in ovarian cancer cells is presented in Fig. 9. In cisplatin-sensitive cell line A2780, Akt1 total expression was more decreased by combined treatment (A). The expression did not significantly decrease in A2780CP. LMB seemed to abrogate the slight increase of Akt1 induced by cisplatin alone. The same phenomenon was observed for Akt2 as the drop due to the combination is equivalent to LMB effect (Fig. 9B). In summary, the combined treatment caused an additive decrease of Akt1 and Akt2 in A2780 as well in EN-1078D. LMB seemed to cancel the effect of cisplatin on Akt increased expression in cisplatin-resistant cell lines.

After Akt isoforms expression, apoptosis induction by combined therapy has been studied by western blotting. Fig. 10A compares relative PARP cleavage levels in endometrial cell lines. The increase of apoptosis observed in EN-1078D treated with combination is higher than the apoptosis of both single treatments together. There would be a synergistic effect between the molecules. However, apoptosis markers in KLE stayed almost undetectable. For ovarian cancer cells (Fig. 10B), cisplatin had much more effect on apoptosis in A2780 combined with LMB than alone, in a synergistic way again. A2780CP showed a weak increase of PARP cleavage in presence of combined treatment.

Discussion

Chemoresistance is one of the main obstacles to anti-cancer therapy success. Gynecological cancers such as endometrial and ovarian carcinomas are not exceptions and present high frequency of resistance to chemotherapy. Among known drugs, cisplatin is widely used to treat gynecological tumours. These possess various deregulated signalling pathways to block drug-induced cell death. Akt has been studied for its implication in cisplatin resistance of gynecological cancers. This survival protein is regulated by different mechanisms including transcription and post-translational modifications, and possibly through its subcellular localization. Besides, Akt isoforms

are not all modulated the same way. The regulation of Akt isoforms in the context of chemoresistance is poorly understood. Little is known about their localization in response to cisplatin.

Specifically, to better understand whether Akt isoforms are regulated by cisplatin, we analyzed their intracellular localization in endometrial and ovarian cancer cells. Protein level of cytosol, nucleus and whole cell lysis were analyzed by western blot. A pathway that could directly regulate Akt intracellular distribution is cytosol-nucleus transport. As presented previously, Akt isoforms possess a nuclear export sequence allowing interaction with CRM-1. CRM-1 was specifically inhibited with leptomycin B, to better understand the molecular mechanisms behind cisplatin response. To complete the analysis of our cancer cell line response to cisplatin, we investigated whether Akt isoform localization and expression would be linked to cisplatin-induced apoptosis. In summary, our results showed that Akt1 and Akt2 expression was decreased by cisplatin and LMB treatment more dramatically in cisplatin-sensitive cell lines. The protein level decrease was predominantly nuclear for Akt1. Akt2 cytosolic loss was especially observed with apoptosis induction. Cisplatin increased apoptosis in sensitive cell lines. Combined therapy had an additive effect on Akt1 and Akt2 level decrease and apparently a synergic activity on apoptosis induction in cisplatin-sensitive cell lines.

First, cisplatin treatment did not modulate cytosolic level of Akt isoforms alone, but the nuclear level of Akt1 and Akt2 was changed (Fig. 2-3). Akt1 was strongly reduced in the nuclear fraction of A2780, which are highly sensitive to the drug according to our apoptosis analysis. The cells could maintain their cytosolic level of Akt1 almost stable despite the important decrease of whole cell Akt1 caused by cisplatin. Such phenomena were not present in the cisplatin-resistant variant A2780CP. Nuclear Akt1 could thus underlie cisplatin resistance. Akt1 is predominantly cytosolic but it can inhibit apoptosis through its nuclear targets too, such as FOXO-1 [45].

Regarding Akt2 in endometrial cell lines, it was only decreased in the nucleus of KLE, where the apoptosis was nearly undetectable, but in both fractions of EN-1078D.

This suggest that nuclear Akt2 would not be the most important in cisplatin response. KLE could favour cytosolic Akt2 to inhibit apoptosis. Actually, when Akt2 was lost in the cytosolic fraction, all our cell lines showed strong apoptosis markers with cisplatin as well as LMB. It is difficult to explain specifically this mechanism because Akt1 and Akt2 expression were also modulated. It will be necessary to distinguish the role of Akt localization from its expression in apoptosis induction. Nevertheless, altered localization of Akt could affect its capacity to reach some targets. Akt2 generally localizes to the cytosol, like Akt1, and specifically to the mitochondria. Its specialized mitochondrial function would be involved in apoptosis inhibition, as shown in non-small cell lung cancer cells [46]. With this in mind, specific cytosolic reduction of Akt2 decreases available proteins to inhibit apoptosis in the cytosol. Currently, the nuclear role of each Akt isoform is not well understood. Nevertheless, these results reveal an important difference between Akt1 and Akt2 distribution regulation which will need more investigation. This could reveal a new chemoresistance mechanism.

The present study showed interesting results about Akt expression. Cisplatin decreased Akt1 whole cell level in both endometrial and ovarian sensitive cell lines (Fig. 2-3). Inversely, we observed an increase of whole cell Akt1 in cisplatin-resistant cell lines in response to cisplatin. This increase could explain the absence of apoptosis, in accordance with the literature. Our team had shown that Akt knock-down, especially Akt1 and Akt2, with siRNA or shRNA sensitized endometrial cancer cells to cisplatin [15, 26]. And Akt1 overexpression could confer cisplatin resistance to endometrial and lung cancer cell lines [26, 47]. Akt1 overexpression would favour various anti-apoptotic pathways through Bad direct phosphorylation, caspase-9 phosphorylation and inhibition of MDM2-mediated p53 degradation, among others [48-50]. Then, western blot analyses also revealed induction of apoptosis in cell lines presenting very low levels of Akt2. On the other hand, Akt2 expression stayed almost stable in KLE and A2780CP. According to these results, Akt1 protein level could be more determinant for cisplatin resistance than Akt2, without excluding a role for Akt2. A study demonstrated that overexpression of Akt2 in ovarian cancer cell line A2780 reduced cisplatin-induced apoptosis [28]. This isoform had to be constitutively activated to inhibit apoptosis

through blockage of JNK and p38 signalling. Another study from our group demonstrated that total Akt protein level was decreased by cisplatin in A2780, but that the phosphorylated form of Akt was highly increased [51]. This overactivation was attributed to caspase-mediated PTEN degradation. However, it was not sufficient to inhibit apoptosis. Akt1 and Akt2 could both be important in cisplatin response in gynecological cancer cells but by different mechanisms. Nevertheless, the current observation was confirmed with the effect of combined cisplatin and LMB treatment; synergistic pro-apoptotic action was seen only when Akt1 and Akt2 dramatically dropped in response to this therapy. This phenomenon was seen in endometrial as well as ovarian cell lines. The phosphorylation status of Akt isoforms in response to cisplatin will need more investigation, because their activation is determinant for their anti-apoptotic action.

To complete the analysis of Akt isoforms, Akt3 was not modulated by cisplatin in our cancer cell models. The first studies on Akt isoform involvement in cisplatin resistance showed that Akt3 was not an important modulator of resistance in gynecological cancers, unlike Akt1 and Akt2. However, a recent study showed that Akt3 expression was necessary for cisplatin resistance in some ovarian cancer cell lines [52]. The authors identified a microRNA targeting Akt3, miR-489, that was downregulated in cisplatin-resistant cell lines. The expression of Akt3 was essential for cisplatin resistance. As noticed here, cisplatin would not regulate Akt3 but the isoform could inhibit partially the apoptosis response to the drug. Besides, Akt3 expression was only detected in our cisplatin-resistant cell lines. Gagnon et al. (2008) showed that cisplatin reduced Akt1/3 whole cell level in HeLa which are highly sensitive to this drug [53]. However, overexpression of any Akt isoform alone didn't improve cisplatin resistance to apoptosis in HeLa. A combination of two or three isoforms could be necessary for cisplatin resistance. As seen in the present study, cisplatin-resistant cancer cell lines are different from cisplatin-sensitive through Akt1 overexpression and Akt3 basal expression. Our results indicate a fundamental difference among Akt isoforms regulation and between sensitive and resistant cell lines.

Leptomycin B was used specifically to induce nuclear sequestration of Akt (Fig. 4-5). This treatment modulated Akt1 intracellular distribution in A2780. The most important decrease of Akt1 level was observed in the nuclear protein fraction. Akt2 was also decreased predominantly in the nucleus of KLE and A2780. This suggests that Akt1 and Akt2 distribution is affected by LMB but not because of decreased nuclear export. Nevertheless, the efficiency of LMB in our cell lines was validated (Fig. S1-2). LMB covalently modifies CRM-1 but it is not degraded. The cells have to do *de novo* synthesis to re-establish nuclear export, causing CRM-1 accumulation [54]. Here, CRM-1 expression analysis showed the increased expression by LMB as also demonstrated in the literature [43]. Immunofluorescent targeting of cyclin B1 supported this conclusion (Fig. S2). Cyclin B1 associates with Cdk1 (Cyclin-dependant kinase-1) during cell cycle to control G₂/M transition. The complex accumulates in an inactive form in the cytosol during interphase [55, 56]. At the beginning of prophase, cyclin B1 – Cdk1 complex is activated and rapidly translocated to the nucleus to induce many changes in cell structure, essential for mitosis [55]. Cyclin B1 is then degraded at the end of the metaphase [56]. Cytosolic accumulation of cyclin B1 is attributed to CRM-1-mediated nuclear export, which is inhibited by leptomycin B [44]. LMB efficiently sequestered cyclin B1 in the nucleus of all our cancer cell lines. Taken together our results suggest that intracellular distribution of Akt is not dependent on CRM-1-mediated nuclear export. To better understand the implication of nuclear transport in Akt localization induced by cisplatin, it would be interesting to study the regulation of TCL-1. It is involved in Akt translocation to the nucleus. Finally, LMB treatment induced an increase of Akt3 expression in KLE which are highly resistant to the drug according to our apoptosis analysis. On the other hand, in A2780CP this regulation was not observed and they slightly entered apoptosis in presence of LMB. Our results on Akt3 expression and other recent studies point out the importance of this isoform in response to chemotherapy of gynecological cancers. This will need more investigation.

All things considered, cisplatin and leptomycin B had a similar effect on Akt isoform whole cell expression in cell lines entering apoptosis. It could be attributed to an

Akt regulation mechanism, other than nuclear export machinery, that would be induced with apoptosis. Akt protein levels could be reduced by proteasomal degradation following polyubiquitination by different E3 ligases [10]. MULAN was demonstrated as an E3 ligase directly interacting with Akt1 and Akt2 to induce their K48-linked ubiquitination [57]. This kind of ubiquitination leads to proteasomal degradation. The authors demonstrated that Akt had to be phosphorylated to interact with MULAN. This would be concordant with our previous study showing an increase of pAkt despite decreased Akt protein in response to cisplatin [51]. So, the reduced Akt level observed in the present study could be caused by ubiquitin-mediated degradation induced by cisplatin. The phosphorylation status of Akt isoforms in our context will need more investigation. We have shown that Akt can be cleaved by active caspase-3 in a cisplatin-sensitive ovarian cancer cell line [58]. This was accompanied by Akt protein level decrease. This mechanism could also explain the similar Akt decrease caused by cisplatin and leptomycin B, as caspase-3 cleavage was induced by both drugs.

In the present study, LMB could potentiate cisplatin-induced apoptosis in sensitive cell lines. Actually, our laboratory and others demonstrated an synergistic pro-apoptotic activity of CRM-1 inhibitors and cisplatin in combination [33, *in preparation*]. Considering the results shown here, it would be through pathways non-essential for our cisplatin-resistant cell line survival. Nevertheless, Lin et al. [59] have shown a synergistic effect on apoptosis induction between cisplatin and a specific Akt inhibitor, MK-2206, in ovarian cancer cells. Use of LY294002, a PI3K inhibitor, also increased cisplatin-induced apoptosis in various cancer cell lines through Akt pathway inhibition [60, 61]. That reinforces the importance of Akt activity for cisplatin resistance in gynecological cancers.

Our study points out a new mechanism of Akt regulation in cisplatin response. We demonstrated that, in addition to whole cell protein decrease, Akt intracellular distribution was affected by pro-apoptotic treatments. Furthermore, differences between Akt isoform modulation were noticed. Only Akt1 expression was increased by cisplatin. Then, cytosolic loss of Akt2 could be especially important for cisplatin sensitivity.

Besides, only cisplatin-resistant cell lines expressed Akt3. We only investigated some mechanisms that can regulate Akt intracellular distribution in response to pro-apoptotic signals. It is crucial to better understand this modulation. The results shown here on Akt localization are caused by a complex regulation of the isoforms, combined with their expression regulation. The next step would be to dissect each process, like gene expression, polyubiquitination leading to degradation and caspase-mediated cleavage, to identify the specific mechanism for each isoform. How cisplatin regulates this process has to be solved. This knowledge will help understanding molecular processes behind cisplatin resistance.

Conclusion

The aberrant regulation of protein kinase Akt is often associated to tumorigenesis as in gynecological cancers. Its expression and activity promote chemoresistance and we know that Akt signalling is also regulated through its intracellular localization. To the best of our knowledge, we are the first to show a differential distribution of Akt isoforms in response to cisplatin in *in vitro* models of gynecological cancers. The study exposed cisplatin-induced Akt protein expression and distribution. Besides, an isoform-specific regulation emerged from these results. Targeting Akt in chemotherapy is already an option; future studies could focus on intracellular protein localization mechanisms to improve chemotherapy specificity and efficiency.

Declarations

Abbreviations

Cdk1: cyclin-dependant kinase 1; Cdk2: cyclin-dependant kinase 2; CRM-1: chromosome region maintenance-1; FOXO: forkhead box protein O; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LMB: leptomycin B; mTORC2: mechanistic target of rapamycin complex 2; NES: nuclear export signal; PARP: poly ADP ribose polymerase; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase-1; PH: pleckstrin

homology domain; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PIP₂: phosphatidylinositol diphosphate; PIP₃: phosphatidylinositol triphosphate; PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; TCL-1: T-cell leukemia 1; WCE: whole cell extract; XPO-1: exportin-1.

Acknowledgment

We thank our lab collaborators Valérie Leblanc, Kevin Brasseur, Stéphanie Lamontagne, Mathieu Raymond-Béliveau, Amélie Roberge-Viau and Matheus Silvia Malo for their support and technical assistance. We would like to mention the collaboration of Dre Carole Lavoie and Dre Céline Van Themsche for some antibodies. F.-H. J. and F. F. hold a FRQS master and doctoral fellowship respectively. This work has been supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). E.A. holds a Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology.

References

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
2. Colombo, N., et al., *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi33-8.
3. Chaudhry, P. and E. Asselin, *Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(2): p. 363-80.
4. Moss, C. and S.B. Kaye, *Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management*. Eur J Cancer, 2002. **38**(13): p. 1701-7.
5. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. Oncogene, 2012. **31**(15): p. 1869-83.
6. Cohen, M.M., Jr., *The AKT genes and their roles in various disorders*. Am J Med Genet A, 2013. **161a**(12): p. 2931-7.
7. Cheung, M. and J.R. Testa, *Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(3): p. 234-44.
8. Toker, A. and S. Marmioli, *Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease*. Adv Biol Regul, 2014. **55**: p. 28-38.
9. Risso, G., et al., *Akt/PKB: one kinase, many modifications*. Biochem J, 2015. **468**(2): p. 203-14.
10. Chan, C.H., et al., *Posttranslational regulation of Akt in human cancer*. Cell Biosci, 2014. **4**(1): p. 59.
11. Shayesteh, L., et al., *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 99-102.
12. Fabi, F. and E. Asselin, *Expression, activation and role of AKTs in the uterus*. Reproduction, 2014.
13. Risinger, J.I., et al., *PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 3005-10.

14. Cai, Y., et al., *Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway enhances the sensitivity of the SKOV3/DDP ovarian cancer cell line to cisplatin in vitro*. Chin J Cancer Res, 2014. **26**(5): p. 564-72.
15. Gagnon, V., et al., *AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(3): p. 785-95.
16. Romano, G., *The role of the dysfunctional akt-related pathway in cancer: establishment and maintenance of a malignant cell phenotype, resistance to therapy, and future strategies for drug development*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 317186.
17. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
18. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
19. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
20. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 197-208.
21. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
22. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
23. Chin, Y.R. and A. Toker, *Akt isoform-specific signaling in breast cancer: uncovering an anti-migratory role for palladin*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(3): p. 211-4.
24. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression*. Biomol Concepts, 2011. **2**(1-2): p. 1-11.
25. Grabinski, N., et al., *Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells*. Cell Signal, 2011. **23**(12): p. 1952-60.

26. Girouard, J., et al., *Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells*. Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 335-43.
27. Rouette, A., et al., *Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1755-67.
28. Yuan, Z.Q., et al., *AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23432-40.
29. Fraser, M., et al., *p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7081-8.
30. Badve, S., et al., *Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2139-49.
31. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3028-33.
32. Saji, M., et al., *Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 167-73.
33. Turner, J.G. and D.M. Sullivan, *CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer*. Curr Med Chem, 2008. **15**(26): p. 2648-55.
34. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
35. Santi, S.A. and H. Lee, *The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(3): p. C580-91.
36. Martelli, A.M., et al., *The emerging multiple roles of nuclear Akt*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(12): p. 2168-78.
37. Los, M., et al., *Switching Akt: from survival signaling to deadly response*. Bioessays, 2009. **31**(5): p. 492-5.
38. Maddika, S., et al., *Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 979-88.

39. Dery, M.C., et al., *Characterization of EN-1078D, a poorly differentiated human endometrial carcinoma cell line: a novel tool to study endometrial invasion in vitro*. Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 38.
40. Louie, K.G., et al., *Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine*. Cancer Res, 1985. **45**(5): p. 2110-5.
41. Brasseur, K., et al., *ERalpha-targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid*. Endocrinology, 2013. **154**(7): p. 2281-95.
42. Weng, D., et al., *Implication of the Akt2/survivin pathway as a critical target in paclitaxel treatment in human ovarian cancer cells*. Cancer Lett, 2009. **273**(2): p. 257-65.
43. Turner, J.G., et al., *CRMI Inhibition Sensitizes Drug Resistant Human Myeloma Cells to Topoisomerase II and Proteasome Inhibitors both In Vitro and Ex Vivo*. J Cancer, 2013. **4**(8): p. 614-25.
44. Yang, J., et al., *Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRMI*. Genes & Development, 1998. **12**(14): p. 2131-2143.
45. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011. **1813**(11): p. 1978-1986.
46. Lee, M.W., et al., *Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration*. Cancer Sci, 2011. **102**(10): p. 1822-8.
47. Liu, H., et al., *FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in lung cancer cells*. Anti-cancer drugs, 2014. **25**(8): p. 898-907.
48. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-241.
49. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-1321.
50. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nature cell biology, 2001. **3**(11): p. 973-982.
51. Singh, M., et al., *Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 233.

52. Wu, H., et al., *MiR-489 modulates cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by targeting Akt3*. Anticancer Drugs, 2014. **25**(7): p. 799-809.
53. Gagnon, V., et al., *Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol*. Apoptosis, 2008. **13**(2): p. 259-71.
54. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9112-7.
55. Jackman, M., M. Firth, and J. Pines, *Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus*. The EMBO journal, 1995. **14**(8): p. 1646.
56. Pines, J. and T. Hunter, *Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport*. The Journal of cell biology, 1991. **115**(1): p. 1-17.
57. Bae, S., et al., *Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase*. Cell Res, 2012. **22**(5): p. 873-85.
58. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer research, 2001. **61**(5): p. 1862-1868.
59. Lin, Y.H., et al., *The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015. **388**(1): p. 19-31.
60. Fujiwara, M., et al., *Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2008. **27**(1): p. 1.
61. Sinnberg, T., et al., *Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide*. Journal of Investigative Dermatology, 2009. **129**(6): p. 1500-1515.

Legends

Table 1: Gynecological cancer cell line characteristics used in the present study.

Figure 1: Characterization of Akt proteins in gynecological cancer cells. Expression and phosphorylation of Akt isoforms were analyzed by western blot of whole cell lysis of endometrial (EN-1078D, KLE) and ovarian (A2780, A2780CP) carcinoma cell lines used in this study. Ponceau S staining confirmed that an equal quantity of protein was loaded for each sample.

Figure 2: Cisplatin-induced deregulation of Akt1 and Akt2 in endometrial carcinoma cell lines. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein localization and expression were studied by western blots of cytosolic and nuclear protein fractions and whole cell extract (WCE) respectively. Cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1 and Akt2 reported on loading controls: GAPDH and β -actin. Values were normalized with the control (non treated). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 3: Cisplatin-induced deregulation of Akt1 and Akt2 in ovarian carcinoma cell lines. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein localization and expression were studied by western blots of cytosolic and nuclear protein fractions and whole cell extract (WCE) respectively. Cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1 and Akt2 reported on loading controls: GAPDH and β -actin. Values were normalized with the control (non treated). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 4: Leptomycin B-induced loss of Akt1 and Akt2 in endometrial carcinoma cell lines. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein localization and expression were studied by western blots of cytosolic and nuclear protein fractions and whole cell extract (WCE) respectively. Akt3 (C) whole cell expression was studied by western blot also. Cell lines were treated with 10 nM, 20 nM or 40 nM leptomycin B. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1, Akt2 and Akt3 reported on loading

controls: GAPDH and β -actin. Values were normalized with the control (non treated).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 5: Leptomycin B-induced loss of Akt1 and Akt2 in ovarian carcinoma cell lines. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein localization and expression were studied by western blots of cytosolic and nuclear protein fractions and whole cell extract (WCE) respectively. Akt3 (C) whole cell expression was studied by western blot also. Cell lines were treated with 10 nM, 20 nM or 40 nM leptomycin B. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1, Akt2 and Akt3 reported on loading controls: GAPDH and β -actin. Values were normalized with the control (non treated). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 6: Cisplatin and leptomycin B-induced apoptosis in endometrial cell lines. Cisplatin-sensitive (EN-1078D) and cisplatin-resistant (KLE) cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin (cis) or 10 nM to 40 nM leptomycin B (LMB). (A) Apoptosis was analyzed by western blot detection of caspase-3 (Cl. casp-3) and PARP (Cl. PARP) cleavage. β -actin was used as loading control. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for cleaved PARP reported on full-length PARP for cisplatin (B) and LMB (C) treatment. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 7: Cisplatin and leptomycin B-induced apoptosis in ovarian cell lines. Cisplatin-sensitive (A2780) and cisplatin-resistant (A2780CP) cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin (cis) or 10 nM to 40 nM leptomycin B (LMB). (A) Apoptosis was analyzed by western blot detection of caspase-3 (Cl. casp-3) and PARP (Cl. PARP) cleavage. β -actin was used as loading control. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for cleaved PARP reported on full-length PARP for cisplatin (B) and LMB (C) treatment. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 8: Combined treatment-induced decrease of Akt1 and Akt2 in endometrial carcinoma cell lines. Cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin and/or 10 nM, 20 nM or 40 nM leptomycin B. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein expression was

studied by western blots of whole cell extract. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1 and Akt2 reported on loading control, β -actin. Values were normalized with the control (non treated). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 9: Combined treatment-induced decrease of Akt1 and Akt2 in ovarian carcinoma cell lines. Cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin and/or 10 n, 20 nM or 40 nM leptomycin B. Akt1 (A) and Akt2 (B) protein expression was studied by western blots of whole cell extract. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for Akt1 and Akt2 reported on loading control, β -actin. Values were normalized with the control (non treated). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure 10: Combined therapy-induced apoptosis in gynecological cancer cell lines. (A) Endometrial and (B) ovarian cell lines were treated with 10 μ M or 20 μ M cisplatin (cis) and/or 10 nM to 40 nM leptomycin B (LMB). Apoptosis was analyzed by western blot detection of PARP cleavage. Graphs show densitometric and statistical analyses of western blots for cleaved PARP reported on full-length PARP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figure S1: CRM-1 upregulation by leptomycin B. CRM-1 expression was detected by western blots of whole cell lysates. Endometrial and ovarian carcinoma cell lines were treated, or not (CTL), with 10 μ M or 20 μ M cisplatin (cis) or 10 nM to 40 nM leptomycin B (LMB). β -actin was used as loading control.

Figure S2: Cyclin B1 nuclear sequestration by leptomycin B. (A) Endometrial and (B) ovarian cell lines were treated, or not (CTL), with 20 nM leptomycin B (LMB). Cyclin B1 was marked with 488-conjugated antibody (green) and nuclei were marked with hoechst (blue).

Tables

Table 1

Cell line	Cancer type	Akt status	pAkt status	Cisplatin sensitivity
EN-1078D	Endometrial adenocarcinoma	1, 2	+	Sensitive
KLE	Endometrial adenocarcinoma	1, 2, 3	1, 2, 3	Resistant
A2780	Ovarian adenocarcinoma	1, 2	1, 2	Sensitive
A2780CP	Ovarian adenocarcinoma	1, 2, 3	1, 2	Resistant

Figures

Figure 1

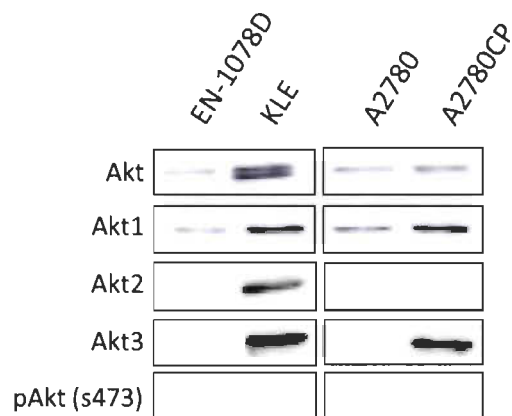


Figure 2

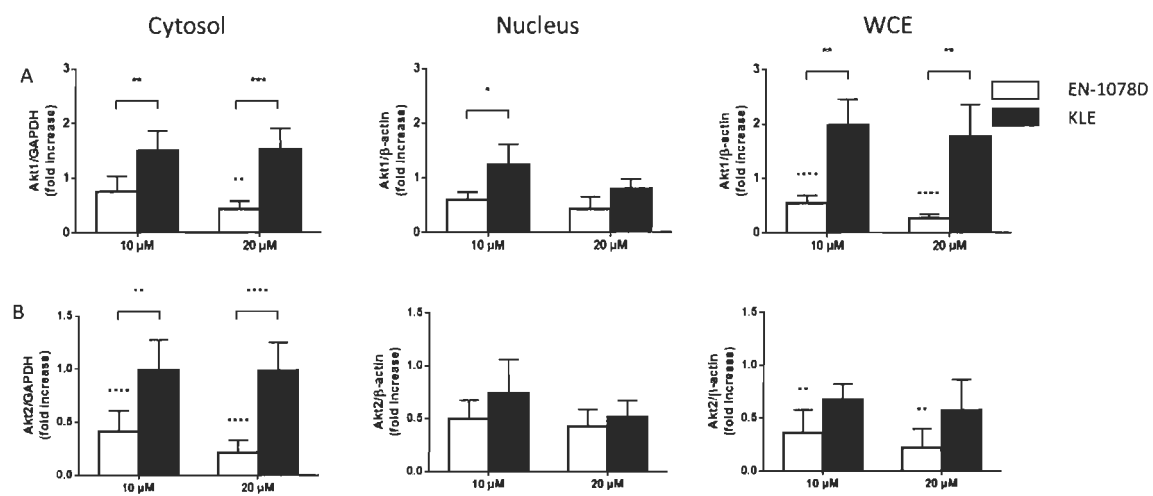


Figure 3

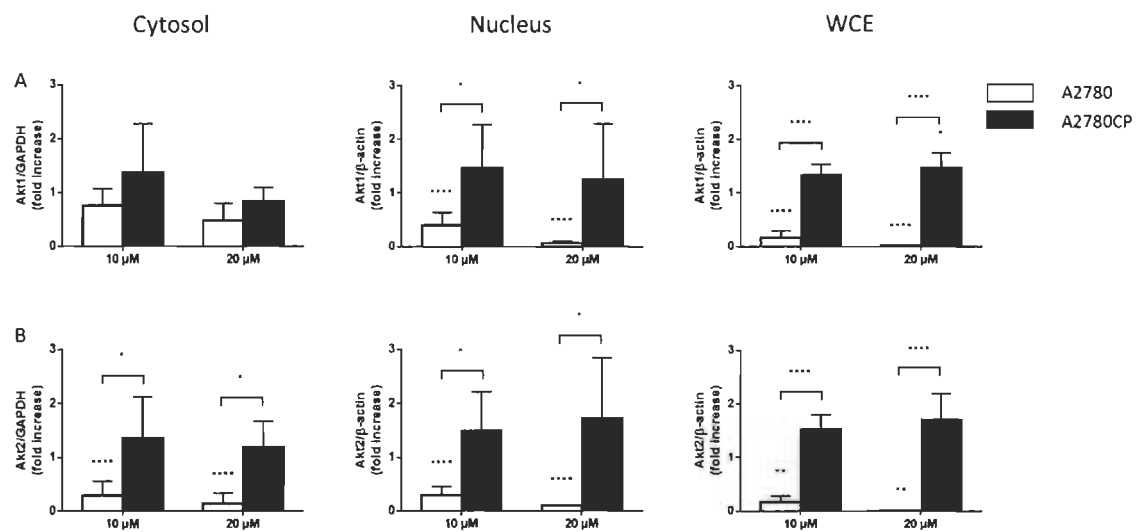


Figure 4

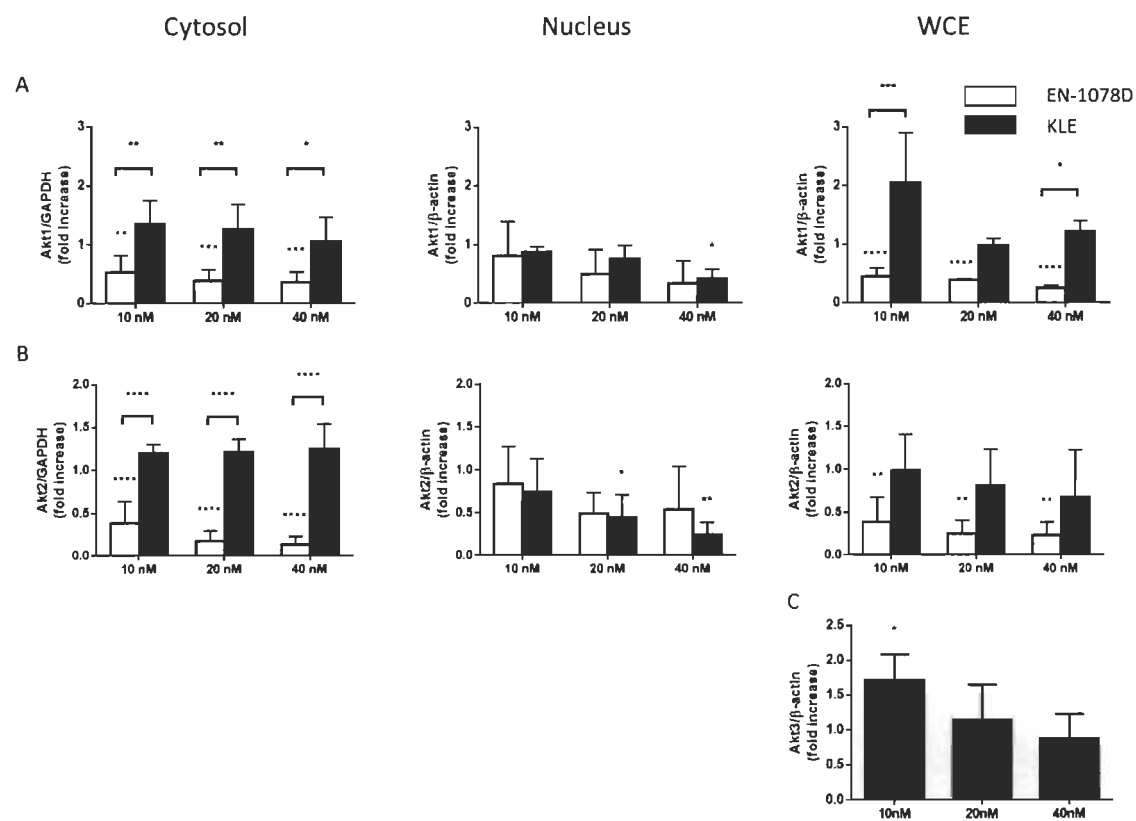


Figure 5

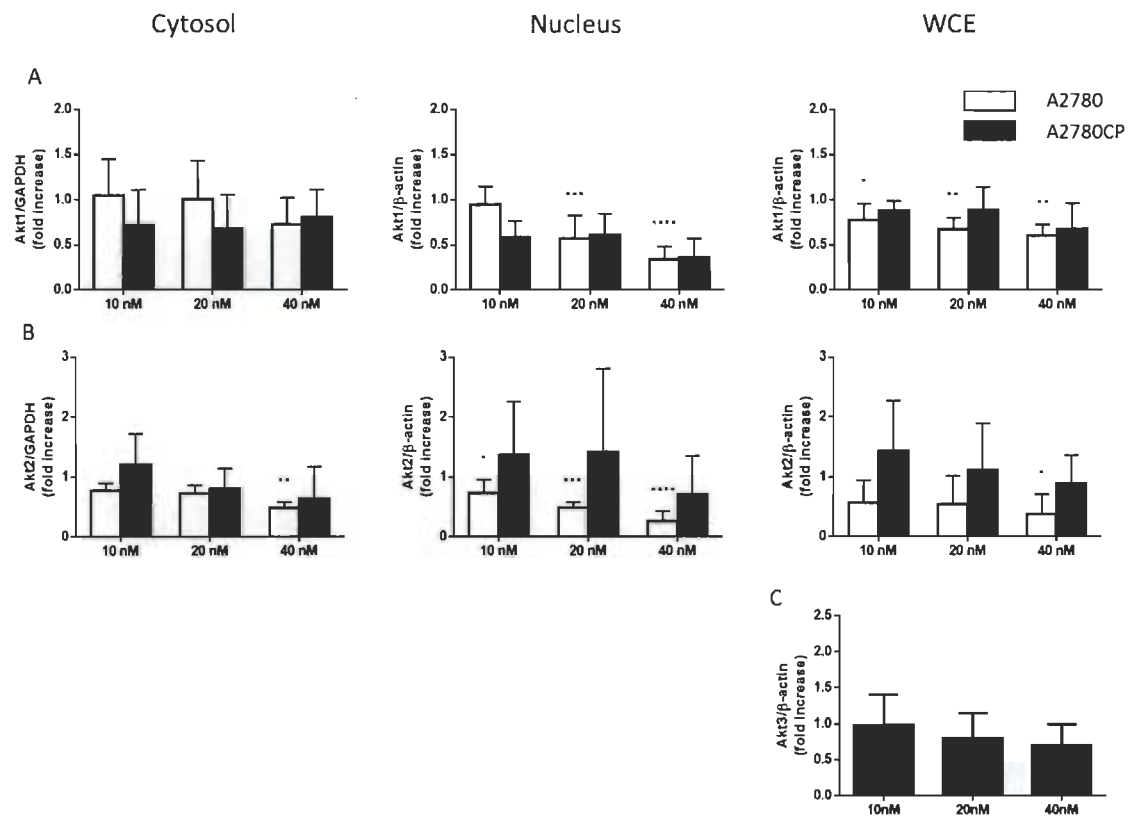


Figure 6

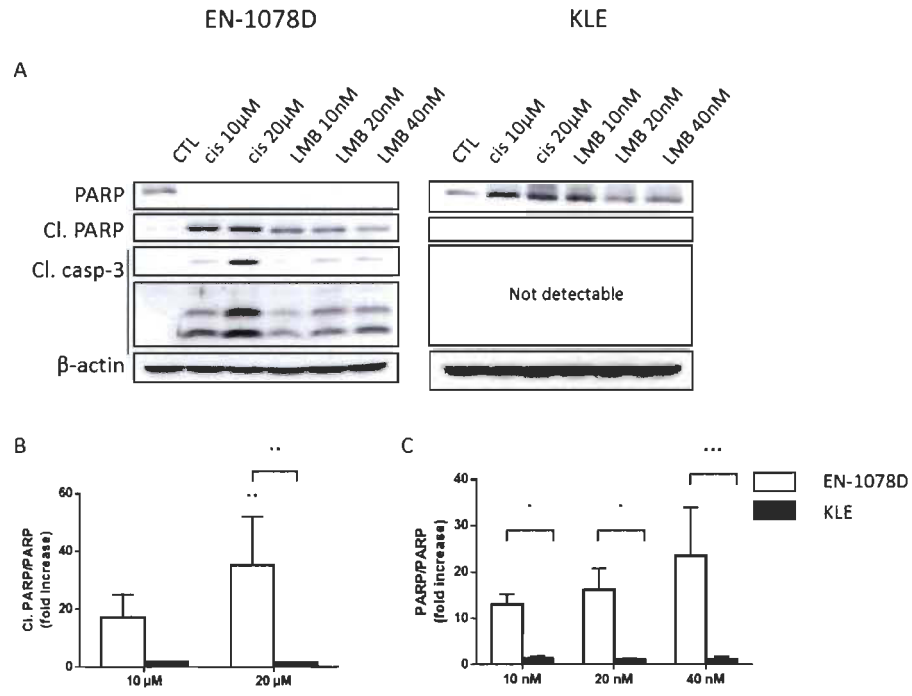


Figure 7

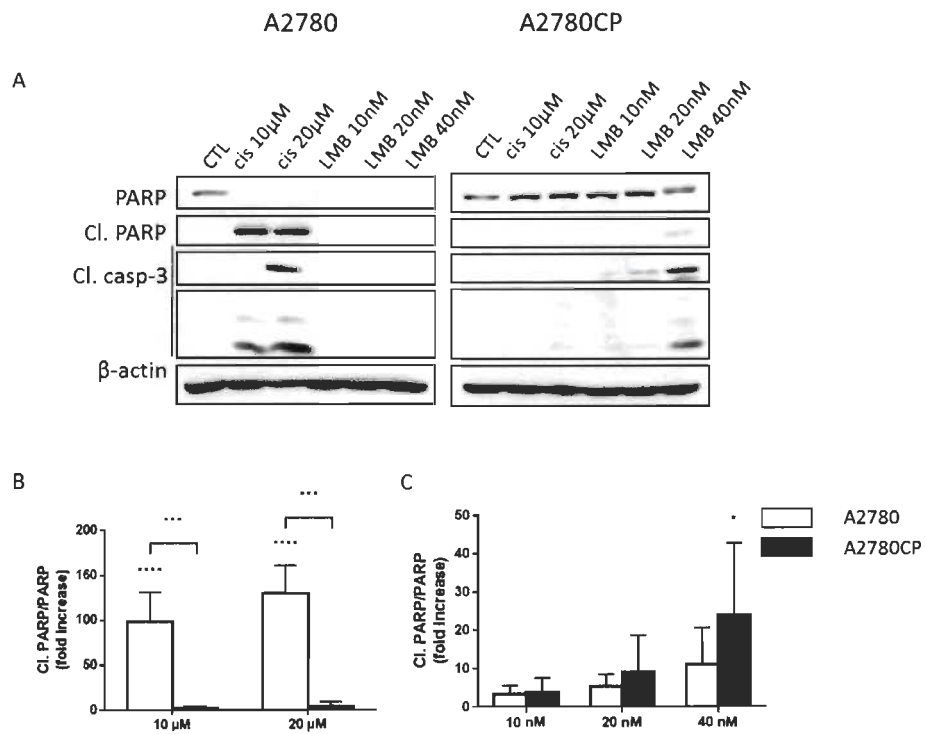


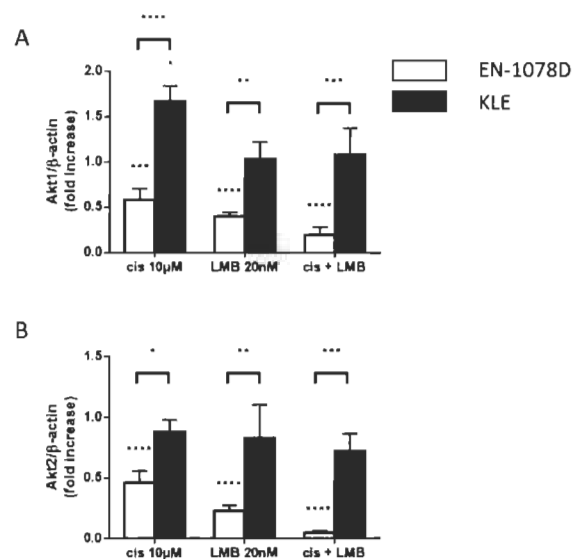
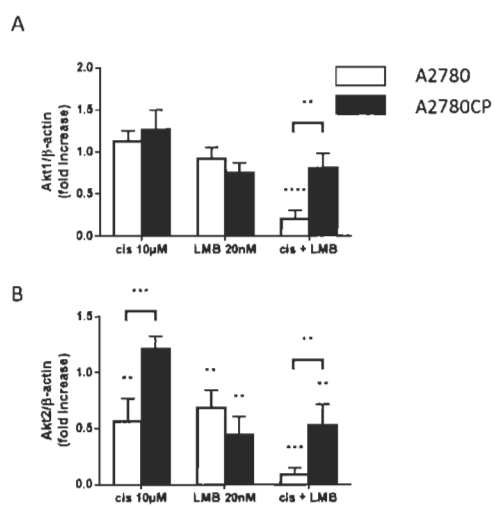
Figure 8**Figure 9**

Figure 10

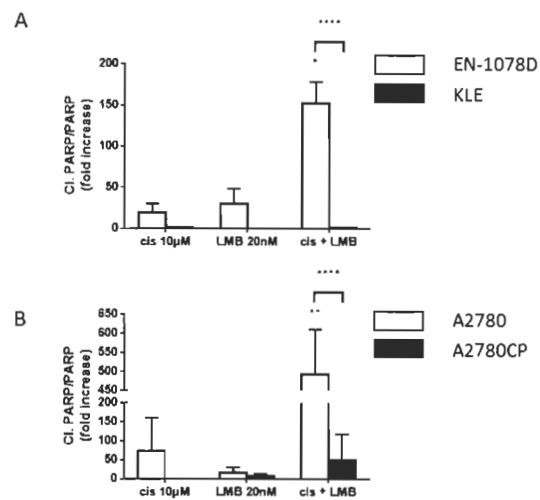


Figure S1

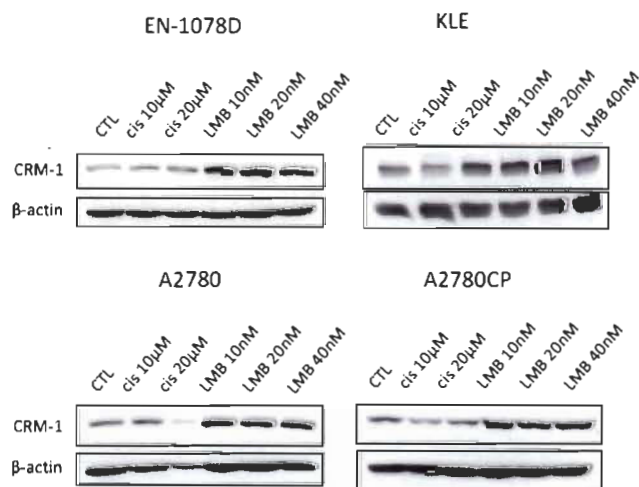
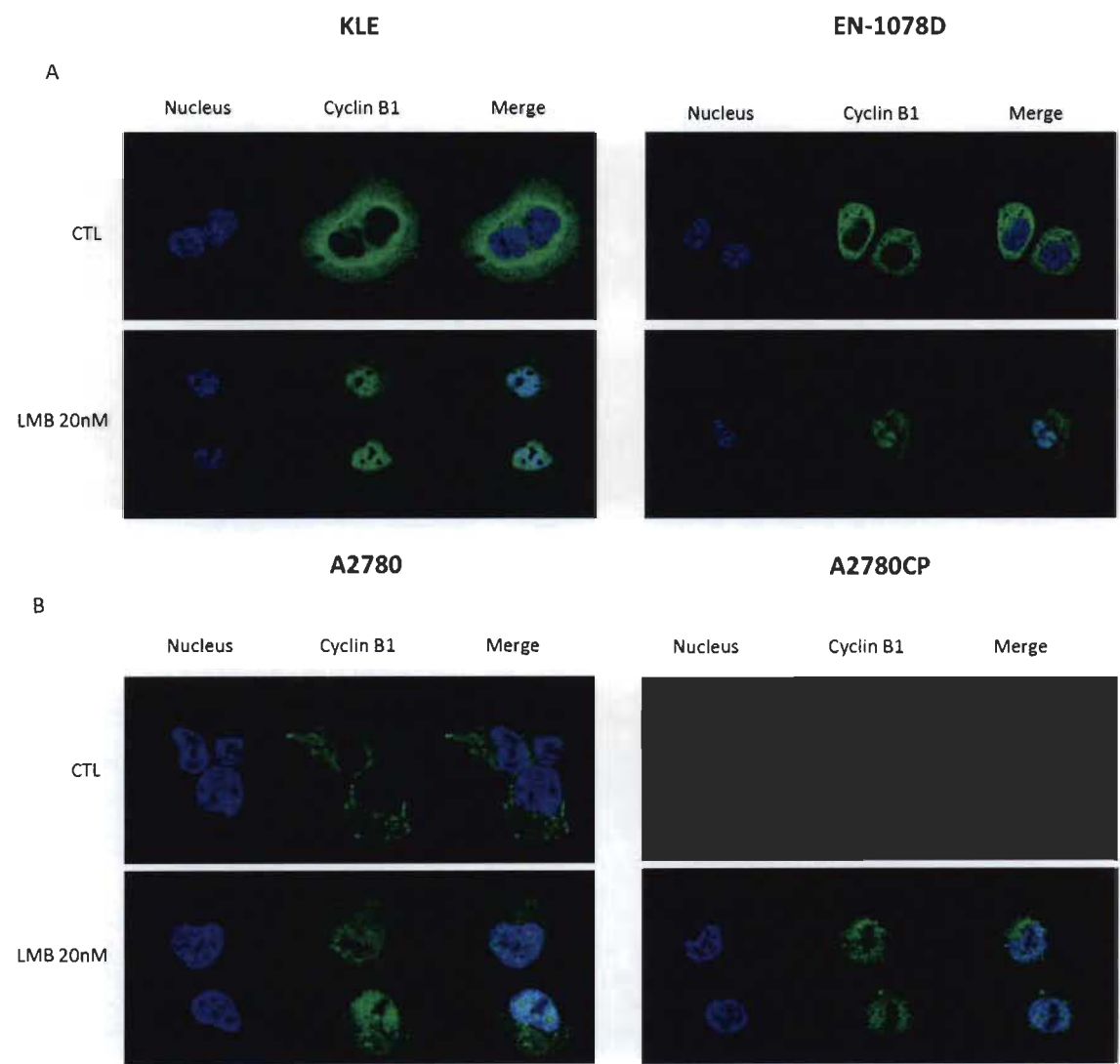


Figure S2



CHAPITRE III

DISCUSSION

Le cancer est l'une des principales causes de décès en occident. Il y a énormément de recherche fondamentale et clinique menée pour combattre cette maladie extrêmement complexe. La médecine se dirige de plus en plus vers des thérapies personnalisées, un concept qui s'applique parfaitement au cancer. En effet, chaque cancer est différent. Il résulte d'un ensemble complexe de mutations et d'altérations dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires regroupées sous les grandes caractéristiques du cancer. Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leurs signaux de prolifération soutenus combinés au blocage des suppresseurs de croissance. Elles possèdent également des propriétés favorisant la migration et la formation des métastases. Elles forment une tumeur en acquérant l'immortalité répliquative. La tumeur peut progresser grâce à l'angiogenèse. Parmi ces caractéristiques majeures, on retrouve aussi les mécanismes de résistance à la mort cellulaire. Leur activité est fortement accrue dans les cellules cancéreuses ce qui permet de faire croître une tumeur en échappant aux contrôles naturels. Ces mécanismes favorisent également la survie des cellules tumorales face à la chimiothérapie. Il est question du phénomène de chimiorésistance.

Pour atteindre l'objectif de la médecine personnalisée, il est crucial de comprendre la mécanistique moléculaire des tumeurs. Ainsi, en analysant une tumeur, les cliniciens seront en mesure de sélectionner un traitement agissant sur une cible protéique spécifique et adaptée. Les cancers gynécologiques sont parmi les plus fréquents (cancer endométrial) et les plus mortels (cancer ovarien) chez les femmes occidentales. L'une des cibles chimiothérapeutiques à l'étude actuellement est la protéine Akt, dont on connaît trois isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3. C'est une kinase impliquée dans plusieurs processus tumoraux tels que la prolifération, la survie cellulaire et la migration. Akt est également impliqué dans la chimiorésistance, entre autres, en réponse au cisplatine.

Il s'agit d'un médicament déjà utilisé pour traiter plusieurs cancers puisqu'il est efficace pour tuer les cellules cancéreuses. Toutefois, les recherches ont montré que beaucoup de tumeurs possédaient ou acquéraient des mécanismes de résistance à ce médicament. Les cellules peuvent modifier leur interaction avec le médicament pour le rendre inefficace envers sa cible, ou accroître les signaux de survie pour bloquer l'apoptose. De plus, ses effets secondaires sont considérables à cause de son manque de spécificité envers les cellules cancéreuses. En effet, son mode d'action consiste à induire l'apoptose des cellules en prolifération rapide. Chaque isoforme d'Akt semble jouer un rôle de près ou de loin dans cette chimiorésistance. Cependant, leurs fonctions différentielles ne sont pas encore bien comprises. Ils sont régulés différemment au niveau de leur transcription, mais également en fonction du contexte cellulaire et du tissu. De plus, la distribution intracellulaire de chaque isoforme n'est pas la même. Tandis qu'Akt1 et Akt2 sont surtout au cytosol, Akt3 est plus détecté au noyau. Akt2 est spécifique à la mitochondrie. L'expression et l'activité d'Akt peuvent ainsi être régulées par des protéines différentes selon ces facteurs. Enfin, le transport d'Akt entre le cytosol et le noyau affecterait l'atteinte de ses cibles.

Les données actuelles indiquent qu'Akt1 et Akt2 favorisent la résistance au cisplatine dans le cancer endométrial *in vitro*. Selon les premières études, Akt2 serait particulièrement important dans le carcinome ovarien. Toutefois, des études récentes soulèvent l'importance d'Akt3 dans ce cancer. L'export nucléaire d'Akt serait médié par CRM-1. Cette protéine permettant à plusieurs cargos de traverser le pore nucléaire peut être inhibée pharmacologiquement. Le projet de recherche proposait que la localisation intracellulaire des isoformes d'Akt soit modulée par le cisplatine, en fonction de l'apoptose, dans les lignées de cancers gynécologiques. Une telle réponse pourrait être signe d'un processus de chimiorésistance. Dans un premier temps, la distribution cytosol-noyau de chaque isoforme a été analysée dans des lignées cellulaires de cancer endométrial et ovarien. L'impact du cisplatine sur leur localisation et leur expression a pu être approfondi. L'utilisation de la leptomycine B a permis d'analyser la régulation de l'export nucléaire d'Akt. Dans un second temps, la sensibilité des cellules cancéreuses à l'induction de l'apoptose par le cisplatine a été mesurée. Cela permettait

de déterminer, enfin, si la localisation intracellulaire d'un ou plusieurs isoformes d'Akt corrélait avec la résistance au cisplatine.

3.1 Interprétations découlant du projet de recherche

Les lignées cellulaires cancéreuses à l'étude ont été traitées avec différentes doses de cisplatine et de leptomycine B seuls ou en combinaison. L'expression et la localisation de chaque isoforme d'Akt ont été analysées par immunobuvardage de type western. La distribution entre le cytosol et le noyau a été évaluée à partir du fractionnement du contenu protéique des cellules traitées. L'apoptose induite par ces traitements a été mesurée par le clivage des marqueurs protéiques en immunobuvardage également. En premier lieu, le niveau protéique total des deux principaux isoformes, soit Akt1 et Akt2, était fortement diminué en présence de cisplatine dans les lignées cellulaires sensibles. Cette observation corrélait avec l'induction de l'apoptose. D'un autre côté, Akt1 était augmenté dans les lignées cellulaires résistantes au médicament. Cela suggère que l'expression d'Akt1 pourrait être importante dans l'inhibition de l'apoptose induite par le cisplatine. Ces résultats concordent avec ce qui a été démontré dans une autre étude de notre laboratoire sur le cancer endométrial [223]. Ainsi, il serait plus déterminant qu'Akt2. Toutefois, les études précédentes démontraient qu'Akt2, et plus récemment Akt3, étaient majeurs dans la résistance au cisplatine dans l'ovaire. Le rôle spécifique d'Akt1 resterait donc à approfondir dans ce contexte précis. Pour ce faire, il faudrait supprimer Akt1 dans la lignée cellulaire résistante, A2780CP, pour vérifier si cela les rend sensibles. Ces expériences seraient comparées à l'effet de la délétion d'Akt2 ou Akt3. Il est possible que la perte d'Akt1 accompagne l'induction de l'apoptose, mais que son expression ne soit pas suffisante pour la résistance au cisplatine.

L'article présenté ici apporte de nouveaux éléments sur la distribution intracellulaire des isoformes d'Akt. C'est un aspect très peu abordé dans la littérature. D'abord, la diminution d'Akt1 ne semble pas se produire de façon uniforme dans la cellule, mais de façon plus importante au noyau. Cela suggère que la présence nucléaire

d'Akt1 pourrait être plus importante que celle au cytosol pour la résistance au cisplatine. Pour vérifier cette hypothèse, il serait possible de surexprimer une forme des isoformes d'Akt séquestrée au noyau. Le laboratoire travaille actuellement à la production de vecteurs de surexpression pour chaque isoforme d'Akt contenant un signal d'export nucléaire (NES) muté au niveau des trois leucines essentielles. Suite à la suppression d'un isoforme endogène, celui-ci peut être réintégré dans les lignées cellulaires à l'aide de ce nouveau vecteur. Cela permettra de déterminer si la présence nucléaire de l'isoforme est suffisante pour la résistance au cisplatine. Dans une telle situation, il faudrait approfondir ses cibles nucléaires dans le contexte de chimiorésistance. Plusieurs d'entre elles ont été abordées dans le premier chapitre. Ensuite, il semble que la perte cytosolique d'Akt2 était prédominante dans la réponse au cisplatine des cellules sensibles, en comparaison avec la diminution totale ou nucléaire. Aucune séquence de localisation nucléaire (NLS) n'a encore été identifiée dans Akt. Il est donc difficile, pour l'instant, d'introduire une mutation qui provoquerait la séquestration cytosolique d'Akt. Les mêmes vecteurs de surexpression mutés au NES pourraient être utilisés. Dans ce cas, la surexpression d'Akt2 seulement au noyau ne devrait pas rétablir la résistance au cisplatine contrairement à une surexpression totale. Akt2 pourrait aussi être séquestré au cytosol par l'ajout à sa séquence d'un NLS. Toutefois, celui-ci ne devra pas en modifier la conformation ni l'activité.

La leptomycine B a été utilisée pour étudier un mécanisme pouvant être responsable de la distribution intracellulaire d'Akt. Elle permet d'inhiber spécifiquement CRM-1, impliqué dans l'export nucléaire de nombreuses protéines contenant un NES. Or, le présent article montre qu'Akt1 et Akt2 sont préférentiellement diminués dans le noyau des cellules sensibles. C'est à l'opposé de l'effet attendu où Akt devrait être séquestré dans ce compartiment. Il semble que les isoformes d'Akt ne soient pas régulé par CRM-1 dans les lignées de cancers gynécologiques à l'étude. Pour confirmer cette conclusion, il faudrait tout de même analyser la localisation d'Akt après de plus courtes durées de traitement avec la LMB. Certaines études ont montré son efficacité sur l'inhibition de CRM-1 *in vitro* en seulement 0,5 à 2 heures [252-254]. Elles ont

démontré l'accumulation de RanBP1 au noyau, un cofacteur de l'export nucléaire. Or, les essais présentés ici résultent de traitements de 24 h.

En considérant les résultats de façon générale, la LMB a un impact similaire à celui du cisplatine sur le niveau des isoformes d'Akt et l'induction de l'apoptose. Puisqu'Akt ne semble pas régulé par CRM-1, les résultats de la LMB pourraient être attribuables à son effet pro-apoptotique. Cela soulève l'interrogation à savoir si le cisplatine induit une diminution d'Akt pour ainsi permettre le déclenchement de l'apoptose. Au contraire, il pourrait induire l'apoptose ce qui conduirait à la perte protéique d'Akt, par l'activation de la caspase-3, par exemple. Cette dernière possibilité pourrait être vérifiée grâce à un inhibiteur pharmacologique de la caspase. L'hypothèse que la LMB induise l'apoptose par une autre voie que celle d'Akt concorde avec l'effet du traitement combiné sur nos lignées cellulaires cancéreuses. En résumé, dans les cellules sensibles à la chimiothérapie, il y avait une synergie entre les deux molécules du point de vue de l'apoptose, mais pas de l'expression d'Akt. De plus, une équipe a démontré que la LMB sensibilisait des cellules du cancer du col de l'utérus au cisplatine par l'accumulation nucléaire de p53 [255]. Or, il s'agit d'un des nombreux suppresseurs de tumeurs dont l'export nucléaire est médié par CRM-1. Pour comprendre comment cet inhibiteur peut sensibiliser davantage les cellules de cancer endométrial et ovarien au cisplatine, il faudrait analyser les suppresseurs de tumeurs dépendant de CRM-1, dont la fonction est déficiente dans les lignées cellulaires résistantes.

La synthèse de l'étude et les hypothèses en découlant sont représentées à la Figure 3.1. D'abord, Akt doit être apporté à la membrane pour être phosphorylé et ainsi inhiber l'apoptose, tel que décrit dans la littérature. Celle-ci est induite en l'occurrence par le cisplatine et passe par le clivage de la caspase-3. Or, nos résultats montrent une diminution du niveau d'Akt1 et Akt2 dans les cellules sensibles à ce médicament. Ce phénomène pourrait être causé par certains mécanismes moléculaires qui affectent la stabilité d'Akt, tels que l'ubiquitination par une lysine 48, qui provoque sa dégradation au protéasome, ou le clivage par la caspase-3 [128, 256]. Du côté de CRM-1, celui-ci peut favoriser la résistance à l'apoptose en exportant divers suppresseurs de tumeurs

hors du noyau. Une fois polyubiquitinés, ou dans certains cas phosphorylés, ceux-ci sont dégradés au protéasome. L'utilisation de la leptomycine B permet d'inhiber spécifiquement CRM-1. Ainsi, les suppresseurs de tumeurs sont à nouveau actifs au noyau pour bloquer le cycle cellulaire des cellules cancéreuses et induire leur mort. Certains peuvent aussi agir par l'inhibition d'Akt. La LMB provoque également une perte d'Akt1 et Akt2 par un mécanisme inconnu pour l'instant. Tout de même, il pourrait s'agir d'un processus de dégradation activé en même temps que l'apoptose. Pour ce qui est de la distribution intracellulaire des isoformes d'Akt, les résultats présents donnent seulement un bref aperçu de la régulation possible avec le cisplatine. D'une part, la perte d'Akt1 était préférentiellement dans le noyau, suggérant l'implication de ses cibles nucléaires dans la réponse à l'apoptose. D'autre part, la diminution cytosolique d'Akt2 était plus importante dans les lignées cellulaires sensibles au médicament. Or, la région de la cellule où chaque isoforme d'Akt est exprimé pourrait réguler la résistance au cisplatine. Pour inhiber l'apoptose, Akt doit être actif, donc phosphorylé. C'est son niveau de phosphorylation qui déterminera sa capacité à bloquer l'activité du cisplatine. Il faudrait donc évaluer ce paramètre comme il en est question dans la prochaine section.

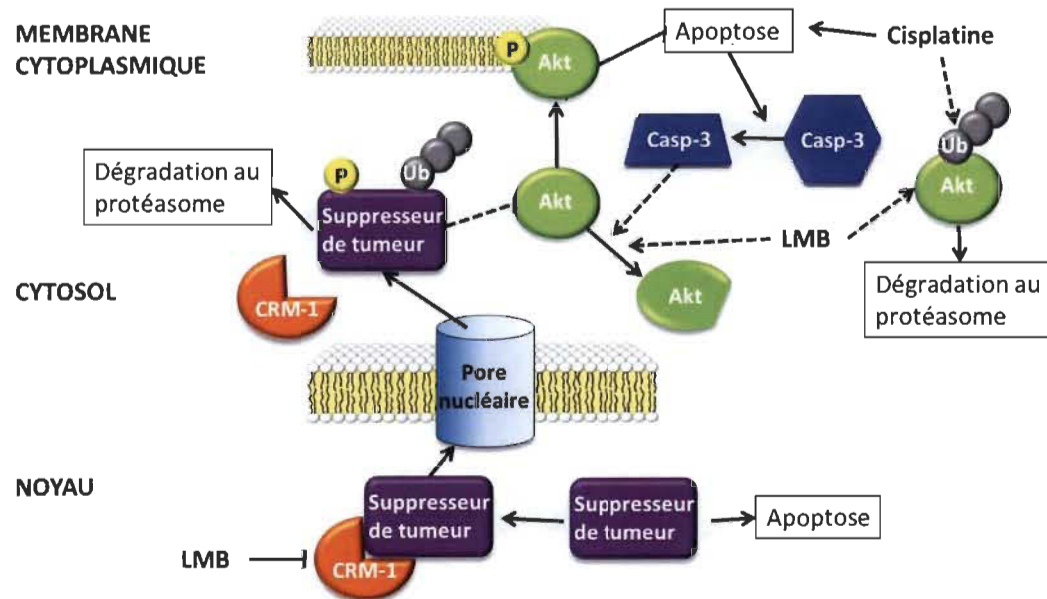


Figure 3.1 Schéma résumant les conclusions du projet de recherche.

Selon la littérature, Akt serait activé à la membrane pour inhiber l'apoptose induite par le cisplatine par l'intermédiaire de la caspase-3. Il est possible qu'Akt soit clivé ou dégradé au protéasome suite au traitement de cisplatine et de leptomycine B (LMB). La LMB pourrait restaurer l'apoptose en gardant les suppresseurs de tumeurs au noyau par l'inhibition de CRM-1. Ils ne seraient plus modifiés ni envoyés au cytosol pour être dégradés. Les protéines sont représentées par les formes de couleurs. Les processus cellulaires déclenchés par ces protéines sont indiqués dans les encadrés. Les flèches représentent activation d'une voie de signalisation et les lignes en « T » représentent l'inhibition. Les lignes pointillées représentent les hypothèses découlant de la recherche. Casp-3 : caspase-3, P : phosphorylation, Ub : ubiquitination.

3.2 Perspectives du projet de recherche

Ce mémoire présente, à notre connaissance, la première étude de la localisation intracellulaire comme une partie de la régulation d'Akt dans le contexte de la chimiorésistance. Il reste encore plusieurs pistes à approfondir pour déterminer comment Akt1 et Akt2 sont différemment distribués dans la cellule et comment cela peut réguler l'apoptose. De plus, il y a encore très peu de données disponibles sur les mécanismes et, surtout les circonstances, régulant le transport d'Akt dans la cellule. Il y a donc certains résultats de l'article présent qui pourraient être approfondis. D'abord, la distribution intracellulaire des isoformes d'Akt a été analysée sur des lyses protéiques fractionnaires en immunobuvardage. Cette méthode ne permet pas de comparer directement le niveau cytosolique et nucléaire d'une protéine, puisqu'elle est basée sur une concentration protéique identique, mais dans des compartiments cellulaires différents. De ce fait, il est plus difficile de conclure qu'une perte cytosolique résulte d'une augmentation nucléaire, ou vice-versa, et de quantifier le phénomène. Il serait donc pertinent d'appuyer ces résultats par des expériences d'immunofluorescence, une méthode plus directe. Ensuite, l'article ne traitait pas de l'activité d'Akt en fonction de sa localisation. Or, l'expression d'Akt3 n'était pas régulé, mais son activation pourrait l'être. Pour y remédier, les mêmes expériences d'immunofluorescence serviraient à cibler la forme phosphorylée d'Akt. On pourrait donc voir si elle est régulée de la même façon que la protéine totale. Dans un deuxième temps, les lignées cellulaires cancéreuses seraient modifiées pour surexprimer chaque isoforme d'Akt constitutivement actif ou dominant

négatif, séquestré soit au cytosol soit au noyau. Les mutants au niveau du NES ou avec un NLS seraient donc combinés à des formes d'Akt phosphomimétiques ou non phosphorylables au niveau de la ser473 et de la thr308. Il serait ainsi possible de vérifier si leur localisation préférentielle et leur activation coïncident avec la chimiorésistance.

L'article présenté dans ce mémoire soulève un point intéressant. Le cisplatine provoquerait une diminution protéique d'Akt1 et Akt2. Or, ce phénomène pourrait être causé par l'ubiquitination d'Akt précédant sa dégradation au protéasome ou par son clivage par la caspase-3. Il serait intéressant de vérifier l'activation de ces deux mécanismes dans nos modèles de cancer. Pour ce faire, l'ubiquitination peut être caractérisée par une immunoprécipitation de chaque isoforme d'Akt suivie d'une analyse de l'ubiquitine par immunobuvardage de type western. Ainsi, une augmentation des formes polyubiquitinées d'Akt avec le traitement de cisplatine suggérerait qu'il induit cette modification pour envoyer Akt au protéasome. Cependant, l'ubiquitination d'Akt par une lysine 63 favorise plutôt son activation à la membrane. Il faudrait donc discerner ces deux modes de régulation. Le protéasome peut être inhibé pharmacologiquement par le MG-132. L'accumulation d'Akt suite au traitement de cisplatine combiné à cet inhibiteur confirmerait l'implication du protéasome dans sa dégradation. D'ailleurs, notre laboratoire avait déjà observé ce qui semblait être une forme polyubiquitinée d'Akt1 et Akt3 (résultats non publiés de Jérôme Grenier-Naud, communication personnelle). Mais il ne semblait pas y avoir de telle modification dans Akt2 selon les études préliminaires. D'un autre côté, le clivage d'Akt en réponse au cisplatine a déjà été démontré dans des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes sensibles au médicament [256]. Toutefois, l'activation de la caspase-3 était bloquée par XIAP dans les lignées résistantes. Il resterait encore à identifier le ou les isoformes d'Akt régulés par ce mécanisme, puisque la distinction n'a pas été faite. Pour déterminer si la caspase-3 est impliquée dans la diminution protéique des isoformes d'Akt observée ici, celle-ci peut être inhibée. Certains résultats non présentés dans l'article du chapitre II semblent montrer un fragment clivé dans Akt3 (Figure 3.2). L'analyse protéique en immunobuvardage montre la forme complète d'Akt3 de 56kDa, mais également une bande constamment observée à environ 45kDa. Il faudrait toutefois confirmer l'identité

de cette bande par une suppression d'Akt3 avec un siARN par exemple. Avec l'inhibition de la caspase-3, le maintien du niveau protéique d'Akt1 ou Akt2, suite au traitement de cisplatine, révélerait son implication dans leur régulation.

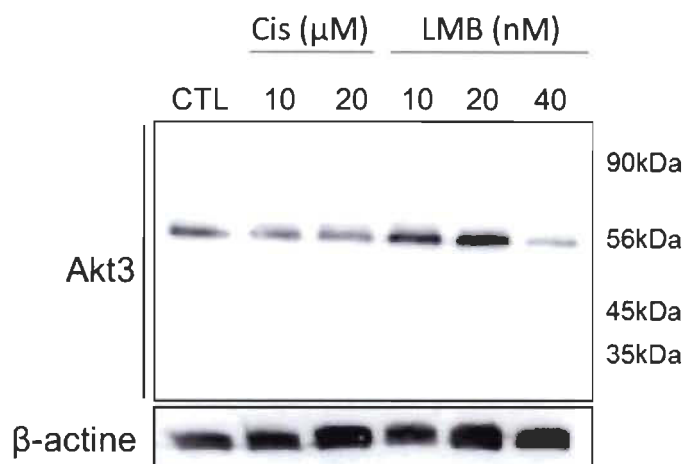


Figure 3.2 Clivage d'Akt3 dans les KLE.

Les cellules ont été traitées avec différentes doses de cisplatine (Cis) et de leptomycine B (LMB) pour 24 h. Les protéines ont été récoltées pour l'analyse par immunobuvardage d'Akt3. La bande correspondant à la forme normale d'Akt3 est à 56 kDa. La forme à 90 kDa serait ubiquitinée et les autres seraient clivées. La β-actine a été utilisé comme contrôle de concentration protéique totale.

Il y a un autre aspect de la régulation protéique d'Akt qui est peu étudié, soit son niveau de transcription. En effet, l'abondance des isoformes d'Akt peut dépendre directement de l'expression de leur gène plutôt que de la stabilité protéique. Pour faire suite à notre étude, l'expression d'Akt pourrait être mesurée par la quantification de l'ARN messenger (ARNm) de chaque isoforme. Cela pourrait être réalisé par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) précédée d'une transcription inverse pour synthétiser l'ADN complémentaire à partir de l'ARNm. À première vue, une seule équipe semble s'être intéressée à la régulation transcriptionnelle d'Akt en réponse au cisplatine. Ils ont utilisé une lignée cellulaire de cancer du côlon [241]. L'étude a démontré que l'expression d'Akt était augmentée transitoirement au niveau transcriptionnel après seulement 6 h de traitement. Cependant, les niveaux de protéines et d'ARNm étaient diminués après 24 h. Pour déterminer si ce mécanisme est impliqué

dans les résultats du présent projet, il serait essentiel d'analyser l'expression des isoformes à différents temps à l'intérieur de 24 h. Enfin, il ne faut pas oublier que les transcrits d'Akt peuvent être ciblés par certains microARNs. Une modification au niveau de l'ARNm ne signifie pas nécessairement que le gène est exprimé différemment. Toutefois, cela influencera la protéine. Tel que présenté précédemment, une équipe a identifié un microARN ciblant le transcrit d'Akt3 dans certaines lignées cellulaires de cancer ovarien [182]. La perte du microARN était associée à une résistance accrue au cisplatine. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de miR-489 dans nos lignées cellulaires cancéreuses. Cela pourrait expliquer la présence d'Akt3 seulement dans nos lignées chimiorésistantes.

Le but ultime d'un projet de recherche sur la chimiorésistance est d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Pour ce faire, il faut combattre le cancer à travers ses nombreuses propriétés qui en favorisent la progression. Plusieurs d'entre elles sont contrôlées par la kinase Akt, notamment la survie et l'inhibition de l'apoptose, la prolifération ainsi que la migration dans la formation des métastases. Akt est également central dans le processus de chimiorésistance dans les cancers gynécologiques. Celui-ci favoriserait la résistance au cisplatine en collaboration avec la protéine PAK4 (p21-activated kinase-4) dans le cancer du col de l'utérus [257]. La voie Akt permettrait aussi la résistance au cisplatine dans le cancer de l'ovaire avec l'aide de la caveolin-1, une protéine structurelle, ou de Rab25, impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire [258, 259]. Toutes ces données, associées à celles présentées précédemment, indiquent qu'Akt régule énormément de voies de signalisation dans le cancer. Il est donc une cible thérapeutique de choix, mais dont l'impact est extrêmement complexe. Il est essentiel de bien comprendre son fonctionnement pour l'utiliser dans la lutte contre la maladie. Sinon, on risque de provoquer des effets secondaires majeurs. D'ailleurs, certaines pathologies, autres que le cancer, soutiennent le rôle fondamental d'Akt dans le corps humain.

Des études chez les souris ont permis d'identifier le rôle physiologique spécifique de chaque isoforme d'Akt. Or, des mutations dans un seul isoforme causent des

pathologies chez l'homme également. La mutation suractivatrice E17K dans Akt2 peut provoquer une surproduction d'insuline qui résulte en hypoglycémie [75, 99]. Des mutations et délétions dans Akt3 causent des anomalies de développement du cerveau, telles qu'une microcéphalie ou une hémimégalencéphalie. Ensuite, une mutation suractivatrice d'Akt1 serait responsable du syndrome de protéus où il y a surcroissance de certaines parties du corps [75]. Enfin, la suractivation de la voie est aussi associée aux phacomatoses, des syndromes caractérisés par des lésions ou des tumeurs de la peau ou du système nerveux et des yeux, tous causés par une prolifération cellulaire trop élevée. Malgré le fait que ce ne soient pas des cancers, on retrouve toujours la dérégulation d'Akt dans la prolifération aberrante. De plus, certaines de ces pathologies sont associées à une fréquence accrue de cancer [75, 99].

3.3 Conclusion

La chimiorésistance constitue un obstacle majeur au combat contre le cancer. Les cancers gynécologiques n'y font pas exception. Akt fait partie des nombreuses kinases impliquées dans la survie cellulaire. Ses isoformes sont suractivés dans plusieurs cancers de façon différentielle, permettant ainsi la chimiorésistance par différentes voies moléculaires. Akt1 et Akt2 seraient particulièrement importants pour la réponse au cisplatine dans le cancer endométrial, tandis qu'Akt2, et plus récemment Akt3, le serait dans le cancer ovarien. Ce qui détermine cette spécificité est toutefois mal compris. Akt possède des cibles cytosoliques et nucléaires. Par contre, les signaux responsables de sa localisation intracellulaire ne sont pas encore bien compris. CRM-1 permettrait son export à travers le pore nucléaire. L'objectif du projet de recherche était de combiner la localisation des isoformes d'Akt avec l'induction de l'apoptose en réponse au cisplatine. Dans un premier temps, il s'agissait de déterminer si le cisplatine influence la distribution intracellulaire des isoformes d'Akt en plus d'affecter leur expression. Ensuite, les modèles cellulaires sensibles au cisplatine étaient comparés aux modèles résistants, du point de vue de l'apoptose, pour vérifier si la localisation d'un isoforme pouvait être décisive dans cette résistance. D'abord, les résultats ont bien confirmé que l'expression totale d'Akt1 et Akt2 en présence de cisplatine correspondait avec le niveau

de résistance. Le mécanisme exact de cette régulation reste à élucider, mais la stabilité protéique d'Akt pourrait être impliquée. La présente étude a soulevé des particularités dans l'importance de chaque isoforme dans le cytosol ou le noyau des cellules cancéreuses. En effet, Akt1 était perdu majoritairement au noyau tandis qu'Akt2 était diminué particulièrement au cytosol en réponse au cisplatine dans les cellules sensibles. Cette distinction s'accorde avec le fait qu'Akt possède des cibles différentes entre le cytosol et le noyau, de même qu'en fonction de l'isoforme activé. Il reste à déterminer si cette modification de localisation est reliée directement à la sensibilité à l'apoptose. Ainsi, la résistance au cisplatine pourrait être diminuée en considérant ces nouvelles données. Cibler médicalement un isoforme en fonction de sa localisation nous permettrait éventuellement de contrer un mécanisme de chimiorésistance. Bien sûr, il faudra d'abord confirmer les conclusions et propositions découlant de cette première étude sur le sujet.

Le projet de recherche présenté dans le cadre de ce mémoire contribue à l'avancement des connaissances sur la régulation spécifique des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance et donc de leur rôle. Il a permis d'approfondir comment ces protéines fortement homologues sont modulées en réponse au cisplatine, communément utilisé en clinique. Certaines de ces données étaient déjà disponibles dans la littérature, mais l'article se distingue par une analyse de la localisation de chaque isoforme dans un contexte de chimiorésistance. Il fait progresser notre compréhension de la régulation fine d'Akt dans les cellules cancéreuses. C'est dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie par des traitements ciblés. Enfin, la multitude de voies de signalisation influencée par Akt dans le cancer réitère l'importance de bien comprendre ses modes de régulation. Il en est de même pour les pathologies non-cancéreuses associées à des mutations dans les isoformes d'Akt.

La chimiothérapie cytotoxique est de moins en moins préconisée à cause des nombreux effets secondaires associés à son activité sur toutes les cellules, saines ou cancéreuses. L'acquisition de mécanismes généraux de résistance à l'apoptose en fait aussi une option moins efficace. Pour atteindre une efficacité accrue, il faut mieux

connaître le comportement des tumeurs au niveau moléculaire. On pourra ainsi cibler précisément les piliers des cellules tumorales qui les distinguent des cellules saines. C'est pourquoi la compréhension de la voie Akt est essentielle dans le combat contre plusieurs cancers. La multitude d'altérations différentes observées entre les types de cancer et les diverses tumeurs mène également vers une personnalisation de la médecine. Il s'agit de distinguer les points sensibles de chaque tumeur pour les utiliser en thérapie. Les isoformes d'Akt peuvent en faire partie, d'où l'importance de comprendre le rôle exact de chaque isoforme. Les points faibles des tumeurs dépendront de leur génome et leur protéome. Enfin, le ciblage de la voie Akt dans un but thérapeutique sera probablement combiné avec celui d'autres voies. Cela permettra de diminuer le potentiel de chimiorésistance des cellules cancéreuses par l'utilisation de voies de signalisation alternatives. Il ne semble pas possible de trouver une thérapie universelle contre le cancer, mais la recherche biomédicale permettra de combattre un cancer à la fois.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Feitelson, M.A., et al., *Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S25-54.
3. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology, 2010. **25**(2): p. 85-101.
4. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
5. CANADA, S., *Les dix principales causes de décès, 2012*, in *Le Quotidien*. 2014, Statistique Canada: Ottawa, Ontario.
6. Ellison, L.F. *Estimation de la survie relative dans le cas du cancer : une analyse du biais attribuable à l'utilisation de tables de mortalité périmées*. Rapports sur la santé, 2014. **25**, 14-21.
7. Blackadar, C.B., *Historical review of the causes of cancer*. World journal of clinical oncology, 2016. **7**(1): p. 54.
8. Rahman, N., *Realizing the promise of cancer predisposition genes*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 302-308.
9. Bishop, J.M., *The molecular genetics of cancer*. Science, 1987. **235**(4786): p. 305-11.
10. Schwingshackl, L. and G. Hoffmann, *Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies*. Cancer medicine, 2015. **4**(12): p. 1933-1947.
11. Byers, T. and R.L. Sedjo, *Body fatness as a cause of cancer: epidemiologic clues to biologic mechanisms*. Endocrine-related cancer, 2015. **22**(3): p. R125-R134.
12. Zane, L., V. Sharma, and T. Misteli, *Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence?* Trends in cell biology, 2014. **24**(11): p. 686-694.

13. Boruban, M.C., et al., *From endometrial hyperplasia to endometrial cancer: insight into the biology and possible medical preventive measures*. European Journal of Cancer Prevention, 2008. **17**(2): p. 133-138.
14. Wright, J.D., et al., *Contemporary management of endometrial cancer*. The Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1352-1360.
15. Plataniotis, G., M. Castiglione, and E.G.W. Group, *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 5**: p. v41-5.
16. SO, A.O.G.S., *Classification and staging of malignant tumours in the female pelvis*. Acta Obstet Gynec Scand, 1971. **50**: p. 1-7.
17. Shimizu, Y., et al., *Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: I. Prognostic significance of histopathologic features—problems involved in the architectural grading system*. Gynecologic oncology, 1998. **70**(1): p. 2-12.
18. Voulgari, A. and A. Pintzas, *Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2009. **1796**(2): p. 75-90.
19. Sommers, C.L., et al., *Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines*. Breast cancer research and treatment, 1994. **31**(2): p. 325-335.
20. Grady, D., et al., *Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. Obstetrics & Gynecology, 1995. **85**(2): p. 304-313.
21. Stuenkel, C.A., et al., *Treatment of symptoms of the menopause: an endocrine society clinical practice guideline*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **100**(11): p. 3975-4011.
22. Renaud, M.C., et al., *Epidemiology and investigations for suspected endometrial cancer*. J Obstet Gynaecol Can, 2013. **35**(4): p. 380-3.
23. Colombo, N., et al., *Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi33-8.
24. Keys, H.M., et al., *A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecologic oncology, 2004. **92**(3): p. 744-751.

25. Creutzberg, C.L., et al., *Survival after relapse in patients with endometrial cancer: results from a randomized trial* ☆. Gynecologic oncology, 2003. **89**(2): p. 201-209.
26. Bradford, L.S., et al., *Advances in the management of recurrent endometrial cancer*. American journal of clinical oncology, 2015. **38**(2): p. 206-212.
27. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. 1993, Montréal: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. 1014.
28. Ramalingam, P., *Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer*. Oncology (Williston Park, NY), 2016. **30**(2).
29. Reade, C.J., et al., *The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada, 2014. **36**(2): p. 133-140.
30. Vang, R., I.-M. Shih, and R.J. Kurman, *Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems*. Advances in anatomic pathology, 2009. **16**(5): p. 267.
31. Seidman, J.D., et al., *The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin*. International journal of gynecological pathology, 2004. **23**(1): p. 41-44.
32. Martelli, A.M., et al., *The emerging multiple roles of nuclear Akt*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(12): p. 2168-78.
33. Banks, E., *The epidemiology of ovarian cancer*. Methods Mol Med, 2001. **39**: p. 3-11.
34. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology I*. Endocrine reviews, 2001. **22**(2): p. 255-288.
35. Prat, J., *FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication*. Journal of gynecologic oncology, 2015. **26**(2): p. 87-89.
36. Heintz, A., et al., *Carcinoma of the ovary*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2006. **95**: p. S161-S192.
37. Prat, J., A. Ribé, and A. Gallardo, *Hereditary ovarian cancer*. Human pathology, 2005. **36**(8): p. 861-870.

38. Toss, A., et al., *Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes*. BioMed research international, 2015. **2015**.
39. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
40. Chaudhry, P. and E. Asselin, *Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(2): p. 363-80.
41. Leslie, K.K., et al., *Endometrial cancer*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2012. **39**(2): p. 255.
42. Moss, C. and S.B. Kaye, *Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management*. Eur J Cancer, 2002. **38**(13): p. 1701-7.
43. Baskar, R., et al., *Biological response of cancer cells to radiation treatment*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2014. **1**.
44. Glaser, S.M. and S. Beriwal, *Brachytherapy for malignancies of the vagina in the 3D era*. J Contemp Brachytherapy, 2015. **7**: p. 312-318.
45. Kataria, S. and S. Kuman, *The role of radiotherapy in ovarian cancer*. Ind J Medical and Pediatric Oncol, 2007. **23**: p. 18-23.
46. Yokoyama, Y. and H. Mizunuma, *Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy*. World Journal of Clinical Cases, 2013. **1**(6): p. 187-190.
47. Fabian, C., *The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer*. International journal of clinical practice, 2007. **61**(12): p. 2051-2063.
48. Masui, K., et al., *A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments*. Carcinogenesis, 2013. **34**(4): p. 725-38.
49. Rebucci, M. and C. Michiels, *Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(9): p. 1219-26.
50. Schiff, P. and S.B. Horwitz, *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980. **77**(3): p. 1561-1565.

51. Eltabbakh, G.H. and C.S. Awtrey, *Current treatment for ovarian cancer*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2001. **2**(1): p. 109-124.
52. Institute, N.C., *ClinicalTrials.gov*. U.S. National Institutes of Health.
53. Xu, Y. and C. Her, *Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy*. Biomolecules, 2015. **5**(3): p. 1652-1670.
54. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(5): p. 338-350.
55. Fulda, S. and K. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4798-4811.
56. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
57. Wiezorek, J., P. Holland, and J. Graves, *Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer*. Clinical cancer research, 2010. **16**(6): p. 1701-1708.
58. Petrillo, M., et al., *Targeting the hallmarks of ovarian cancer: The big picture*. Gynecologic oncology, 2016.
59. Ali, A.Y., et al., *Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1271**(1): p. 58-67.
60. Alderden, R.A., M.D. Hall, and T.W. Hambley, *The discovery and development of cisplatin*. J. Chem. Educ, 2006. **83**(5): p. 728.
61. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. Oncogene, 2012. **31**(15): p. 1869-83.
62. Harrap, K., *Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative*. Cancer treatment reviews, 1985. **12**: p. 21-33.
63. Stordal, B., N. Pavlakis, and R. Davey, *Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review*. Cancer treatment reviews, 2007. **33**(4): p. 347-357.
64. Perron, V., et al., *Synthesis of 17 β -estradiol-linked platinum (II) complexes and their cytotoxic activity on estrogen-dependent and-independent breast tumor cells*. Bioorganic chemistry, 2005. **33**(1): p. 1-15.

65. Descôteaux, C., et al., *Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum (II) complexes showing potent cytocidal activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta*. Steroids, 2008. **73**(11): p. 1077-1089.
66. Brasseur, K., et al., *ERalpha-targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid*. Endocrinology, 2013. **154**(7): p. 2281-95.
67. Van Themsche, C., et al., *VP-128, a novel oestradiol-platinum (II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo*. Endocrine-related cancer, 2009. **16**(4): p. 1185-1195.
68. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
69. Probst, A.V., E. Dunleavy, and G. Almouzni, *Epigenetic inheritance during the cell cycle*. Nature reviews Molecular cell biology, 2009. **10**(3): p. 192-206.
70. Dolle, L., et al., *Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5592-5601.
71. Hayes, M.P., W. Douglas, and L.H. Ellenson, *Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma*. Gynecologic oncology, 2009. **113**(3): p. 370-373.
72. Harari, D. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. Oncogene, 2000. **19**(53).
73. Thomas, C. and J.-Å. Gustafsson, *Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2015. **26**(9): p. 467-476.
74. Brugge, J., M.-C. Hung, and G.B. Mills, *A new mutational AKTivation in the PI3K pathway*. Cancer cell, 2007. **12**(2): p. 104-107.
75. Cheung, M. and J.R. Testa, *Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(3): p. 234-44.
76. Kim, N.-G., et al., *E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(29): p. 11930-11935.
77. Hawkins, D.S., G.W. Demers, and D.A. Galloway, *Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents*. Cancer research, 1996. **56**(4): p. 892-898.

78. Bottoni, P., M.A. Isgrò, and R. Scatena, *The epithelial–mesenchymal transition in cancer: a potential critical topic for translational proteomic research*. Expert review of proteomics, 2016. **13**(1): p. 115-133.
79. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. Semin Cancer Biol, 2015. **35** Suppl: p. S244-75.
80. Du, F., et al., *Acquisition of paclitaxel resistance via PI3Kdependent epithelialmesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells*. Oncol Rep, 2013. **30**(3): p. 1113-8.
81. Greenberg, R., *Telomeres, crisis and cancer*. Current molecular medicine, 2005. **5**(2): p. 213-218.
82. Yaswen, P., et al. *Therapeutic targeting of replicative immortality*. in *Seminars in cancer biology*. 2015. Elsevier.
83. Ahluwalia, A. and A. S Tarnawski, *Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(1): p. 90-97.
84. Ahn, G.-O., et al., *Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in myeloid cells promotes angiogenesis through VEGF and S100A8*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(7): p. 2698-2703.
85. Saraste, A. and K. Pulkki, *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Cardiovascular research, 2000. **45**(3): p. 528-537.
86. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-54.
87. Fraser, M., et al., *p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7081-8.
88. Okuda, T., et al., *Genetics of endometrial cancers*. Obstetrics and gynecology international, 2010. **2010**.
89. de Hoon, J.P., et al., *Taxane resistance in breast cancer: A closed HER2 circuit?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2012. **1825**(2): p. 197-206.

90. Takara, K., T. Sakaeda, and K. Okumura, *An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy*. Current pharmaceutical design, 2006. **12**(3): p. 273-286.
91. Turner, J.G. and D.M. Sullivan, *CRMI-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer*. Curr Med Chem, 2008. **15**(26): p. 2648-55.
92. Bian, K., et al., *ERK3 regulates TDP2-mediated DNA damage response and chemoresistance in lung cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 6665.
93. Fennell, D., et al., *Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer*. Cancer treatment reviews, 2016. **44**: p. 42-50.
94. McNeil, E.M. and D.W. Melton, *DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy*. Nucleic acids research, 2012. **40**(20): p. 9990-10004.
95. Gagnon, V., et al., *Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol*. Apoptosis, 2008. **13**(2): p. 259-71.
96. Scott, F.L., et al., *XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs*. The EMBO journal, 2005. **24**(3): p. 645-655.
97. Hohlbaum, A.M., S. Moe, and A. Marshak-Rothstein, *Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1209-20.
98. Ghavami, S., et al., *Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes*. Journal of medical genetics, 2009. **46**(8): p. 497-510.
99. Cohen, M.M., Jr., *The AKT genes and their roles in various disorders*. Am J Med Genet A, 2013. **161a**(12): p. 2931-7.
100. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression*. Biomol Concepts, 2011. **2**(1-2): p. 1-11.
101. Martini, M., et al., *PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review*. Ann Med, 2014. **46**(6): p. 372-83.
102. Clark, A.R. and A. Toker, *Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer*. Biochemical Society Transactions, 2014. **42**(5): p. 1349-1355.

103. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7004-9.
104. Hermann, C., et al., *Insulin-mediated stimulation of protein kinase akt a potent survival signaling cascade for endothelial cells*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2000. **20**(2): p. 402-409.
105. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. The EMBO journal, 1996. **15**(23): p. 6541.
106. Hanada, M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Structure, regulation and function of PKB/AKT - a major therapeutic target*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004. **1697**(1): p. 3-16.
107. Toker, A., *Akt signaling: a damaging interaction makes good*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(8): p. 356-9.
108. Bozulic, L., et al., *PKB α /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival*. Molecular cell, 2008. **30**(2): p. 203-213.
109. Persad, S., et al., *Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(29): p. 27462-27469.
110. Xie, X., et al., *I κ B kinase ϵ and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(16): p. 6474-6479.
111. Huang, B.X., et al., *Threonine 34 phosphorylation by phosphoinositide-dependent protein kinase 1 facilitates dissociation of Akt from the plasma membrane*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2015. **64**: p. 195-201.
112. Toker, A. and S. Marmiroli, *Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease*. Adv Biol Regul, 2014. **55**: p. 28-38.
113. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton, *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth*. Molecular cell, 2005. **18**(1): p. 13-24.
114. Seshacharyulu, P., et al., *Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer*. Cancer letters, 2013. **335**(1): p. 9-18.

115. Tremblay, F., et al., *Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient-and obesity-induced insulin resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(35): p. 14056-14061.
116. Pederson, T.M., D.L. Kramer, and C.M. Rondinone, *Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 24-31.
117. Chan, C.H., et al., *Posttranslational regulation of Akt in human cancer*. Cell Biosci, 2014. **4**(1): p. 59.
118. Liao, Y. and M.-C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 19-42.
119. Risso, G., et al., *Akt/PKB: one kinase, many modifications*. Biochemical Journal, 2015. **468**(2): p. 203-214.
120. Liu, P., et al., *Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 541.
121. Chen, R., et al., *Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(34): p. 31858-31862.
122. Mahajan, K., et al., *Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation*. PloS one, 2010. **5**(3): p. e9646.
123. Wang, G., et al., *K63-linked ubiquitination in kinase activation and cancer*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 5.
124. Yang, W.L., et al., *The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1134-8.
125. Yang, W.L., et al., *Cycles of ubiquitination and deubiquitination critically regulate growth factor-mediated activation of Akt signaling*. Sci Signal, 2013. **6**(257): p. ra3.
126. Risso, G., et al., *Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle*. Cell cycle, 2013. **12**(19): p. 3354-3363.
127. Noguchi, M., N. Hirata, and F. Suizu, *The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(2): p. 342-52.
128. Bae, S., et al., *Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase*. Cell Res, 2012. **22**(5): p. 873-85.

129. Su, C.H., et al., *Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase*. Cell Signal, 2011. **23**(11): p. 1824-30.
130. Suizu, F., et al., *The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt*. Developmental cell, 2009. **17**(6): p. 800-810.
131. Sundaresan, N.R., et al., *The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy*. Sci Signal, 2011. **4**(182): p. ra46.
132. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
133. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. DNA repair, 2016. **42**: p. 63-71.
134. Vervoorts, J. and B. Lüscher, *Post-translational regulation of the tumor suppressor p27KIP1*. Cellular and molecular life sciences, 2008. **65**(20): p. 3255-3264.
135. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nature cell biology, 2001. **3**(11): p. 973-982.
136. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-241.
137. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X L*. Cell, 1996. **87**(4): p. 619-628.
138. Bai, D., L. Ueno, and P.K. Vogt, *Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt*. International Journal of Cancer, 2009. **125**(12): p. 2863-2870.
139. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-1321.
140. Whiteman, E.L., H. Cho, and M.J. Birnbaum, *Role of Akt/protein kinase B in metabolism*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2002. **13**(10): p. 444-451.
141. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-789.

142. Robey, R.B. and N. Hay. *Is Akt the "Warburg kinase"?- Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis*. in *Seminars in cancer biology*. 2009. Elsevier.
143. Ward, P.S. and C.B. Thompson, *Signaling in control of cell growth and metabolism*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(7): p. a006783.
144. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. Journal of cell science, 2009. **122**(20): p. 3589-3594.
145. Faridi, J., et al., *Akt promotes increased mammalian cell size by stimulating protein synthesis and inhibiting protein degradation*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2003. **285**(5): p. E964-E972.
146. Karar, J. and A. Maity, *PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis*. Frontiers in molecular neuroscience, 2011. **4**: p. 51.
147. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circulation research, 2002. **90**(12): p. 1243-1250.
148. Grabinski, N., et al., *Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells*. Cell Signal, 2011. **23**(12): p. 1952-60.
149. Karam, A.K., et al., *Cisplatin and PI3kinase inhibition decrease invasion and migration of human ovarian carcinoma cells and regulate matrix-metalloproteinase expression*. Cytoskeleton, 2010. **67**(8): p. 535-544.
150. Lee, M.W., et al., *Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration*. Cancer Sci, 2011. **102**(10): p. 1822-8.
151. Wang, J.P., et al., *The collective nuclear migration of p53 and phosphorylated S473 of Akt during ellipticine-mediated apoptosis in human lung epithelial cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2015. **407**(1-2): p. 123-33.
152. Saji, M., et al., *Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 167-73.
153. Rosner, M., et al., *Nuclear/cytoplasmic localization of Akt activity in the cell cycle*. Amino acids, 2007. **32**(3): p. 341-345.
154. Jain, M.V., et al., *Nuclear localized Akt enhances breast cancer stem-like cells through counter-regulation of p21(Waf1/Cip1) and p27(kip1)*. Cell Cycle, 2015. **14**(13): p. 2109-20.

155. Jänicke, R.U., et al., *The multiple battles fought by anti-apoptotic p21*. Cell Cycle, 2007. **6**(4): p. 407-413.
156. Gartel, A.L., *p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm?* Biofactors, 2009. **35**(2): p. 161-4.
157. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011. **1813**(11): p. 1978-1986.
158. Huang, W.-C. and C.-C. Chen, *Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(15): p. 6592-6602.
159. Maddika, S., et al., *Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 7): p. 979-88.
160. Maddika, S., et al., *Unscheduled Akt-triggered activation of cyclin-dependent kinase 2 as a key effector mechanism of apoptin's anticancer toxicity*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1235-48.
161. Tavassoli, M., et al., *Apoptin: specific killer of tumor cells?* Apoptosis, 2005. **10**(4): p. 717-724.
162. Badve, S., et al., *Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2139-49.
163. Los, M., et al., *Switching Akt: from survival signaling to deadly response*. Bioessays, 2009. **31**(5): p. 492-5.
164. Thomas, C.C., et al., *High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate*. Current Biology, 2002. **12**(14): p. 1256-1262.
165. Fabi, F. and E. Asselin, *Expression, activation and role of AKTs in the uterus*. Reproduction, 2014.
166. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular signalling, 2002. **14**(5): p. 381-395.
167. Fukuda, M., et al., *CRMI is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. Nature, 1997. **390**(6657): p. 308-11.

168. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1*. Exp Cell Res, 1998. **242**(2): p. 540-7.
169. Lee, M.W., et al., *Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration*. Cancer science, 2011. **102**(10): p. 1822-1828.
170. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
171. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
172. Peng, X.-d., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. Genes & development, 2003. **17**(11): p. 1352-1365.
173. Yang, Z.-Z., et al., *Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Ba (PKBa) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(23): p. 10407-10418.
174. Dummler, B., et al., *Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 8042-51.
175. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
176. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 197-208.
177. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
178. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
179. Romano, G., *The role of the dysfunctional akt-related pathway in cancer: establishment and maintenance of a malignant cell phenotype, resistance to therapy, and future strategies for drug development*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 317186.

180. Santi, S.A. and H. Lee, *The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(3): p. C580-91.
181. Cristiano, B.E., et al., *A specific role for AKT3 in the genesis of ovarian cancer through modulation of G2-M phase transition*. Cancer Research, 2006. **66**(24): p. 11718-11725.
182. Wu, H., et al., *MiR-489 modulates cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by targeting Akt3*. Anticancer Drugs, 2014. **25**(7): p. 799-809.
183. Dickmanns, A., T. Monecke, and R. Ficner, *Structural Basis of Targeting the Exportin CRM1 in Cancer*. Cells, 2015. **4**(3): p. 538-568.
184. Adachi, Y. and M. Yanagida, *Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a Schizosaccharomyces pombe gene crm1+ which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery*. The Journal of cell biology, 1989. **108**(4): p. 1195-1207.
185. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
186. Ossareh-Nazari, B., F. Bachelierie, and C. Dargemont, *Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export*. Science, 1997. **278**(5335): p. 141-4.
187. Turpin, P., B. Ossareh-Nazari, and C. Dargemont, *Nuclear transport and transcriptional regulation*. FEBS letters, 1999. **452**(1-2): p. 82-86.
188. Fornerod, M., et al., *The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88*. The EMBO journal, 1997. **16**(4): p. 807-816.
189. Kehlenbach, R.H., et al., *A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export*. J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 645-57.
190. Marchenko, N.D., et al., *Stress-mediated nuclear stabilization of p53 is regulated by ubiquitination and importin-alpha3 binding*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 255-67.
191. Turner, J.G., et al., *CRM1 Inhibition Sensitizes Drug Resistant Human Myeloma Cells to Topoisomerase II and Proteasome Inhibitors both In Vitro and Ex Vivo*. J Cancer, 2013. **4**(8): p. 614-25.

192. Kau, T.R., et al., *A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells.* Cancer cell, 2003. **4**(6): p. 463-476.
193. Henderson, B.R. and A. Eleftheriou, *A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals.* Experimental cell research, 2000. **256**(1): p. 213-224.
194. Yang, J., et al., *Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1.* Genes & Development, 1998. **12**(14): p. 2131-2143.
195. Noske, A., et al., *Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer.* Cancer, 2008. **112**(8): p. 1733-1743.
196. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9112-7.
197. Sun, Q., et al., *Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(4): p. 1303-1308.
198. Newlands, E., G. Rustin, and M. Brampton, *Phase I trial of elactocin.* British journal of cancer, 1996. **74**(4): p. 648.
199. Pekarsky, Y., C. Hallas, and C.M. Croce, *The role of TCL1 in human T-cell leukemia.* Oncogene, 2001. **20**(40).
200. Noguchi, M., et al., *Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt.* The FASEB Journal, 2007. **21**(10): p. 2273-2284.
201. Laine, J., et al., *The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator.* Molecular cell, 2000. **6**(2): p. 395-407.
202. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3028-33.
203. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-365.
204. Hong, B., M. Le Gallo, and D.W. Bell, *The mutational landscape of endometrial cancer.* Current opinion in genetics & development, 2015. **30**: p. 25-31.

205. Levine, D.A., et al., *Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(8): p. 2875-2878.
206. Shayesteh, L., et al., *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 99-102.
207. Salvesen, H., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(12): p. 4834-4839.
208. Djordjevic, B., et al., *Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing*. Modern Pathology, 2012. **25**(5): p. 699-708.
209. Matias-Guiu, X., et al., *Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma*. Human pathology, 2001. **32**(6): p. 569-577.
210. Risinger, J.I., et al., *PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 3005-10.
211. Daikoku, T., et al., *Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice*. Cancer research, 2008. **68**(14): p. 5619-5627.
212. Memarzadeh, S., et al., *Cell-autonomous activation of the PI3-kinase pathway initiates endometrial cancer from adult uterine epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17298-303.
213. Patch, A.M., et al., *Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 489-94.
214. Van Themsche, C., et al., *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20462-6.
215. Singh, M., et al., *Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 233.
216. Dobashi, Y., et al., *Diverse involvement of isoforms and gene aberrations of Akt in human lung carcinomas*. Cancer Sci, 2015. **106**(6): p. 772-81.

217. Sun, M., et al., *AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells.* The American journal of pathology, 2001. **159**(2): p. 431-437.
218. Carpten, J.D., et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 439-444.
219. Cohen, Y., et al., *AKT1 pleckstrin homology domain E17K activating mutation in endometrial carcinoma.* Gynecologic oncology, 2010. **116**(1): p. 88-91.
220. Sabbineni, H., et al., *Genetic deletion and pharmacological inhibition of Akt1 isoform attenuates bladder cancer cell proliferation, motility and invasion.* Eur J Pharmacol, 2015. **764**: p. 208-14.
221. Zhou, W., et al., *RNAi knockdown of the Akt1 gene increases the chemosensitivity of gastric cancer cells to cisplatin both in vitro and in vivo.* Regulatory peptides, 2012. **176**(1): p. 13-21.
222. Meng, Q., et al., *Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway.* Cellular signalling, 2006. **18**(12): p. 2262-2271.
223. Girouard, J., et al., *Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells.* Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 335-43.
224. Chin, Y.R. and A. Toker, *Akt isoform-specific signaling in breast cancer: uncovering an anti-migratory role for palladin.* Cell Adh Migr, 2011. **5**(3): p. 211-4.
225. Bellacosa, A., et al., *Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas.* International journal of cancer, 1995. **64**(4): p. 280-285.
226. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(19): p. 9267-9271.
227. Noske, A., et al., *Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer.* Cancer letters, 2007. **246**(1): p. 190-200.
228. Dutt, A., et al., *Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma.* British journal of cancer, 2009. **101**(7): p. 1218.

229. Attoub, S., et al., *Akt2 knock-down reveals its contribution to human lung cancer cell proliferation, growth, motility, invasion and endothelial cell tube formation*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12759.
230. Khabele, D., et al., *Preferential effect of akt2-dependent signaling on the cellular viability of ovarian cancer cells in response to EGF*. J Cancer, 2014. **5**(8): p. 670-8.
231. Rouette, A., et al., *Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1755-67.
232. Yuan, Z.Q., et al., *AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23432-40.
233. Zhang, D., et al., *Inhibition of AKT sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin by abrogating S and G2/M arrest*. Experimental and Molecular Pathology, 2016.
234. Llopis, A., et al., *The stress-activated protein kinases p38 α / β and JNK1/2 cooperate with Chk1 to inhibit mitotic entry upon DNA replication arrest*. Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3627-3637.
235. Weng, D., et al., *Implication of the Akt2/survivin pathway as a critical target in paclitaxel treatment in human ovarian cancer cells*. Cancer Lett, 2009. **273**(2): p. 257-65.
236. Zhou, T., et al., *Effect of spindle checkpoint on Akt2-mediated paclitaxel-resistance in A2780 ovarian cancer cells*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010. **30**(2): p. 206-11.
237. Stahl, J.M., et al., *Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma*. Cancer research, 2004. **64**(19): p. 7002-7010.
238. Chin, Y.R., et al., *Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer*. Cancer Res, 2014. **74**(3): p. 964-73.
239. Stottrup, C., T. Tsang, and Y.R. Chin, *Upregulation of AKT3 Confers Resistance to the AKT Inhibitor MK2206 in Breast Cancer*. American Association for Cancer Research, 2016. **15**(8): p. 1964-1974.

240. Yan, B., et al., *Micro-ribonucleic acid 29b inhibits cell proliferation and invasion and enhances cell apoptosis and chemotherapy effects of cisplatin via targeting of DNMT3b and AKT3 in prostate cancer*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 557-65.
241. Zhang, J., et al., *Regulation of AKT gene expression by cisplatin*. *Oncology letters*, 2013. **5**(3): p. 756-760.
242. Sinnberg, T., et al., *Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009. **129**(6): p. 1500-1515.
243. Cai, Y., et al., *Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway enhances the sensitivity of the SKOV3/DDP ovarian cancer cell line to cisplatin in vitro*. *Chin J Cancer Res*, 2014. **26**(5): p. 564-72.
244. Kondapaka, S.B., et al., *Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(11): p. 1093-103.
245. Al Sawah, E., et al., *Perifosine, an AKT inhibitor, modulates ovarian cancer cell line sensitivity to cisplatin-induced growth arrest*. *Gynecologic oncology*, 2013. **131**(1): p. 207-212.
246. Rehan, M., et al., *Computational insights into the inhibitory mechanism of human AKT1 by an orally active inhibitor, MK-2206*. *PloS one*, 2014. **9**(10): p. e109705.
247. Sun, D., et al. *MK2206 potentiates cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis through an interaction of inactivated Akt signaling pathway*. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2015. Elsevier.
248. Lin, Y.H., et al., *The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015. **388**(1): p. 19-31.
249. Duan, L., et al., *Increasing cisplatin sensitivity by schedule-dependent inhibition of AKT and Chk1*. *Cancer biology & therapy*, 2014. **15**(12): p. 1600-1612.
250. Liu, J. *A Phase II Study of Akt Inhibitor MK2206 in the Treatment of Recurrent Platinum-Resistant Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer*. 2016 May 16, 2016 [cited 2017 January, 6]; Clinical trial of MK2206 on ovarian carcinoma resistant to platinum]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01283035?sect=X01256&view=results>.

251. Sun, H., et al., *KPT-330 has antitumour activity against non-small cell lung cancer*. British journal of cancer, 2014. **111**(2): p. 281-291.
252. Mutka, S.C., et al., *Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo*. Cancer research, 2009. **69**(2): p. 510-517.
253. Plafker, K. and I.G. Macara, *Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(10): p. 3510-3521.
254. Niu, M., et al., *CRM1 is a cellular target of curcumin: new insights for the myriad of biological effects of an ancient spice*. Traffic, 2013. **14**(10): p. 1042-1052.
255. Naniwa, J., et al., *Leptomycin B enhances CDDP-sensitivity via nuclear accumulation of p53 protein in HPV-positive cells*. Cancer science, 2003. **94**(12): p. 1099-1103.
256. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer research, 2001. **61**(5): p. 1862-1868.
257. Shu, X.-R., et al., *PAK4 confers the malignance of cervical cancers and contributes to the cisplatin-resistance in cervical cancer cells via PI3K/AKT pathway*. Diagnostic pathology, 2015. **10**(1): p. 1.
258. Zou, W., et al., *Caveolin-1 mediates chemoresistance in cisplatin-resistant ovarian cancer cells by targeting apoptosis through the Notch-1/Akt/NF- κ B pathway*. Oncology reports, 2015. **34**(6): p. 3256-3263.
259. Fan, Y., et al., *Rab25 is responsible for phosphoinositide 3-kinase/AKTmediated cisplatin resistance in human epithelial ovarian cancer cells*. Mol Med Rep, 2015. **11**(3): p. 2173-8.